

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
RECEPTORES ENDÓGENOS DE LECTINAS DE SEMENTES DA
SUBTRIBO DIOCLEINAE

CLÁUDIA MARTINS DE OLIVEIRA

FORTALEZA – CEARÁ

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
RECEPTORES ENDÓGENOS DE LECTINAS DE SEMENTES DA
SUBTRIBO DIOCLEINAE**

Cláudia Martins de Oliveira

FORTALEZA - CE

2007

CLÁUDIA MARTINS DE OLIVEIRA

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira

FORTALEZA - CE

2007

O46i Oliveira, Cláudia Martins

Identificação e caracterização parcial de receptores endógenos de lectinas de sementes da subtribo Diocleinae/
Cláudia Martins de Oliveira.

106 f.: il.

Orientador: Renato de Azevedo Moreira

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
Fortaleza, 2007.

1. Lectinas 2. Receptor endógeno. 3. Polissacarídeo de parede celular. 4. Diocleinae I. Título. II. Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

CDD. 574.192

Esta Tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Cláudia Martins de Oliveira

TESE APROVADA EM: 16.03. 2007

BANCA EXAMINADORA

.....
Dr. Renato de Azevedo Moreira
Universidade Federal do Ceará
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
(Orientador da Tese)

.....
Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Universidade Federal do Ceará
(Examinadora)

~~.....
Dra. Ana Cristina de O.M. Moreira
Universidade do Ceará
(Examinadora)~~

.....
Dra. Ana Cecília Góes Horta
Universidade Federal do Ceará
(Examinadora)

.....
Dra. Maria das Graças Carneiro da Cunha
Universidade Federal do Pernambuco
(Examinadora)

3

*Aos meus pais, Paulo e Lia, e ao
meu irmão Paulo, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Renato de Azevedo Moreira por dispor-se a me orientar durante o Curso de Doutorado, e pela dedicação e amizade demonstrada durante a execução desta Tese.

Ao Professor Dr. André Newton do Monte Negreiros, da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte, pelo incentivo ao meu sucesso profissional.

À Professora Dr^a Daniele Maria Alves Teixeira Sá, da Universidade Estadual do Ceará, pela co-orientação e solicitude à realização deste trabalho.

Às professoras Ana Cecília Góes Horta, Ana Lúcia Pontes Freitas, Ana Cristina de Oliveira Monteiro-Moreira e Maria das Graças Carneiro da Cunha por terem aceitado compor a banca julgadora desta Tese e pelas sugestões valiosas e atenção prestada.

À Coordenação de Pós-graduação e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará pela solidariedade e colaborações. De modo especial, à amiga Gilcenara de Oliveira e sua família, pela colaboração ímpar nas etapas finais da execução deste trabalho.

À minha família que, embora geograficamente distante, esteve sempre presente, traduzindo-se em apoio e confiança.

A todos os que colaboraram para a concretização deste trabalho, minha sincera gratidão.

Este trabalho foi realizado graças às seguintes Instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de bolsa de Pós-graduação concedida à autora e auxílios concedidos ao Curso de Pós - Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de auxílios prestados ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP), através de convênios com o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foram executados os experimentos deste trabalho.

*"O sonho é ver as formas invisíveis
Da distância imprecisa, e, com sensíveis
Movimentos da esperança e da vontade,
Buscar na linha fria do horizonte
A árvore, a praia, a flor, a ave, a fonte -
Os beijos merecidos da Verdade."
Fernando Pessoa*

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	xiii
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xvi
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xvii
<u>RESUMO</u>	xx
<u>ABSTRACT</u>	xxi
1	01
1.0	01
1.1	06
1.1.1	09
1.1.2	10
1.1.3	11
1.1.4	12
1.2	14
1.3	16
1.3.1	17
1.3.2	18
1.3.3	19
1.3.3.1	22
1.3.4	27
1.4	29
1.4.1	29
1.4.2	31
1.4.3	33
2	35
3	36
4	37
5	38
5.1	38
5.1.1	38
5.1.2	38

5.2	Outros materiais	38
6	Métodos	39
6.1	Identificação botânica das plantas	39
6.2	Preparação das farinhas de sementes	39
6.3	Extração das proteínas das farinhas de sementes	39
6.4	Isolamento das lectinas das frações 090 por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50	40
6.5	Ensaio de atividade hemaglutinante	40
6.6	Obtenção e fracionamento dos polissacarídeos insolúveis das farinhas das sementes	42
6.7	Reticulação do resíduo bruto (R 3) das sementes com epicloridrina	42
6.8	Isolamento das lectinas das frações 090 por cromatografia de afinidade em colunas dos resíduos brutos (R3) reticulados	45
6.9	Análises das frações polissacarídicas dos resíduos brutos (R 3)	45
6.9.1	Hidrólises ácidas	45
6.9.2	Identificação das frações polissacarídicas insolúveis por cromatografia em camada delgada	46
6.9.3	Hidrólise enzimática do amido	46
6.9.4	Retenção das lectinas em colunas das frações FP 1 e FP 4	47
6.9.5	Hidrólise ácida total das frações FP 1 e FP 4, tratadas com α -amilase	47
6.9.6	Redução e acetilação dos polissacarídeos	48
6.9.7	Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (G.L.C-MS)	48
6.10	Identificação e caracterização dos receptores solúveis	49
6.10.1	Imobilização das lectinas purificadas em coluna de Sepharose- 4B ativada	49
6.10.2	Extração e isolamento dos receptores solúveis	49
6.10.3	Cromatografia seqüenciada dos receptores solúveis em colunas de afinidade	50
6.10.4	Determinação quantitativa dos carboidratos dos receptores solúveis	50
6.10.5	Determinação do poder inibitório dos receptores solúveis sobre a atividade hemaglutinante das lectinas	52

6.10.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida	52
7	Resultados e discussão	54
7.1	Isolamento das lectinas por cromatografias de afinidade em coluna de Sephadex G-50	54
7.2	Isolamento das lectinas por cromatografias de afinidade em colunas dos resíduos brutos (R 3) reticulados	56
7.3	Fracionamento dos resíduos brutos (R 3) das farinhas das sementes	62
7.4	Retenção das lectinas em colunas das frações FP 1 e FP 4	62
7.5	Análise da composição monossacarídica dos polissacarídeos insolúveis por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquido-gasosa	65
7.6	Isolamento e caracterização dos receptores solúveis presentes nos extratos salinos de <i>Dioclea altissima</i> , <i>Cratylia floribunda</i> e <i>Canavalia brasiliensis</i>	68
7.6.1	Cromatografias de afinidade dos extratos salinos totais em coluna de Sepharose-4B com lectinas imobilizadas.	69
7.6.2	Cromatografias seqüenciadas em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose-lectina	73
7.6.3	Eletroforeses dos receptores solúveis em gel de poliacrilamida SDS-PAGE	77
7.6.4	Determinação quantitativa de glicídios dos receptores solúveis	81
7.6.5	Determinação do poder inibitório dos receptores solúveis sobre a atividade hemaglutinante das lectinas	81
8	Resumo dos resultados	83
9	Conclusão	85
10	Referências bibliográficas	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pg
1	Representação esquemática dos tipos de lectinas vegetais.	4
2	Estruturas químicas de polissacarídeos hemicelulósicos que ocorrem em sementes.	26
3	Planta e sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> .	30
4	Planta e sementes de <i>Cratylia floribunda</i> .	32
5	Planta e sementes de <i>Dioclea altíssima</i> .	34
6	Esquema de extração e isolamento das lectinas das sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> , <i>Cratylia floribunda</i> e <i>Dioclea altíssima</i> .	41
7	Obtenção e isolamento dos polissacarídeos das farinhas das sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> , <i>Dioclea altíssima</i> e <i>Cratylia floribunda</i> .	43
8	Esquema e reação de reticulação dos resíduos brutos (R 3) com epiclorigrina.	44
9	Extração e isolamento dos receptores solúveis das sementes de <i>Dioclea altíssima</i> , <i>Cratylia floribunda</i> e <i>Canavalia brasiliensis</i> .	51
10	Cromatografias de afinidade das frações 090 de <i>Dioclea altíssima</i> , <i>Cratylia floribunda</i> e <i>Canavalia brasiliensis</i> em coluna de Sephadex G-50.	55
11	Cromatografias de afinidade das frações 090 em coluna dos resíduos brutos (R 3) reticulados de <i>Dioclea altíssima</i> , <i>Cratylia floribunda</i> e <i>Canavalia brasiliensis</i> .	57

- 12 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol das lectinas de *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de resíduo bruto (R 3) de *Dioclea altissima*. 58
- 13 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol das lectinas de *Cratylia floribunda*, *Dioclea altissima* e *Canavalia brasiliensis* isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de resíduo bruto (R 3) de *Canavalia brasiliensis*. 59
- 14 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol das lectinas de *Cratylia floribunda*, *Dioclea altissima* e *Canavalia brasiliensis* isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de resíduo bruto (R 3) de *Cratylia floribunda*. 59
- 15 Retenção das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea altissima* e *Cratylia floribunda* em colunas de afinidade dos polissacarídeos insolúveis das frações FP 1 e FP 4. 64
- 16 Cromatografia em camada delgada dos polissacarídeos obtidos das frações FP 1 e FP 4. 66
- 17 Cromatografia do extrato salino total de *Cratylia floribunda* em coluna de Sepharose-4B com lectinas de *Cratylia floribunda* imobilizadas. 70
- 18 Cromatografia do extrato salino total de *Canavalia brasiliensis* em coluna de Sepharose-4B com lectinas de *Canavalia brasiliensis* imobilizadas. 71
- 19 Cromatografia do extrato salino total de *Dioclea altissima* em coluna de Sepharose-4B com lectinas de *Dioclea altissima* imobilizadas. 72
- 20 Cromatografias seqüenciadas em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose-lectina de *Cratylia floribunda*. 74

- 21 Cromatografias seqüenciadas em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose-lectina de *Canavalia brasiliensis*. 75
- 22 Cromatografias seqüenciadas em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose-lectina de *Dioclea altíssima*. 76
- 23 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol dos extratos de *Dioclea altíssima* e *Cratylia floribunda* e frações obtidas das cromatografias em colunas de Sepharose-lectinas e Sephadex G-50. 78
- 24 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol do extrato de *Canavalia bnrasiensis* e frações obtidas das cromatografias em colunas de Sepharose-lectina e Sephadex G-50. 79
- 25 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% dos receptores solúveis das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altíssima* e frações obtidas das cromatografias em colunas de Sepharose-lectina e Sephadex G-50. 80

LISTA DE TABELAS

- | | | |
|---|---|----|
| 1 | Retenção lectínica pelas colunas de resíduos brutos (R 3) reticulados de <i>Dioclea altíssima</i> , <i>Cratylia floribunda</i> e <i>Canavalia brasiliensis</i> . | 61 |
| 2 | Composição monossacarídica percentual das frações polissacarídicas de sementes de <i>Dioclea altíssima</i> , <i>Cratylia floribunda</i> e <i>Canavalia brasiliensis</i> . | 67 |

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Abs (280nm)	Absorbância a 280nm
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Aspartato
Asn	Asparagina
BSA	Albumina sérica bovina
Gly	Glicina
Glu	Glucose
Glu	Glutamato
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Phe	Fenilalanina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Cb	<i>Canavalia brasiliensis</i>
cDNA	DNA complementar
Cf	<i>Cratylia floribunda</i>
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CNBr	Brometo de cianogênio
ConM	Lectina de <i>Canavalia maritima</i>

Da	<i>Dioclea altissima</i>
DGL	Lectina de <i>Dioclea grandiflora</i>
DVL	Lectina de <i>Dioclea virgata</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GS-IV	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
HGA	Homogalacturonanos
kDa	Kilodalton
LCA	Lectina de <i>Lens culinaris</i>
LoLI	Lectina de <i>Lathyrus ochrus</i>
pH	Potencial de hidrogênio
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PSA	Lectina de <i>Pisum sativum</i>
PNA	Lectina de <i>Arachis hypogae</i>
PRPC	Polissacarídeos de reserva de parede celular
RG	Ramnogalacturonanos
RG-I	Ramnogalacturonano do tipo I
Rf	Fator de retenção
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos
SBA	Lectina de <i>Glycine max</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS - PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS
TFA	Ácido trifluoracético
Tris	Tris-(Hidroximetil)aminometano

VVL - B4	Lectina de <i>Vicia villosa</i>
P 1	Pico 1 eluído da cromatografia do extrato bruto em coluna de Sepharose/lectina
P 2	Pico 2 eluído da cromatografia do extrato bruto em coluna de Sepharose/lectina
S 2	Pico 2 eluído da cromatografia do P 2 em coluna de Sephadex G-50
SL 1	Pico 1 eluído da cromatografia do P 2 em coluna de Sepharose/lectina
SL 2	Pico 2 eluído da cromatografia do P 2 em coluna de Sepharose/lectina
F P 1	Fração polissacarídica 1 extraída com NaOH 1M
FP 4	Fração polissacarídica 4 extraída com NaOH 4 M
R 1	Resíduo 1
R 2	Resíduo 2
R 3	Resíduo bruto

RESUMO

As lectinas constituem uma classe especial de proteínas com a propriedade peculiar de interagir específica e reversivelmente com carboidratos e glicoconjugados. Esta habilidade das lectinas sugere um papel biológico relevante *in vivo*, porém tal hipótese exige a presença de receptores endógenos. A intensificação de pesquisas acerca dessas moléculas receptoras poderá elucidar as funções biológicas endógenas propostas para as lectinas.

Lectinas da subtribo Diocleinae mostram um elevado grau de similaridade estrutural, possuindo afinidade pelos monossacarídeos D-glucose e D-manose, interagindo com uma variedade de carboidratos simples e estruturas glicanas complexas. Receptores glicídicos insolúveis destas lectinas foram obtidos das sementes de *Dioclea altíssima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*. Sementes destegumentadas foram trituradas e a farinha foi submetida à extração das proteínas em solução de NaCl 0,15M. Os resíduos brutos obtidos desta extração foram reticulados com epícloridrina, e as lectinas isoladas por cromatografia de afinidade em colunas dos resíduos brutos reticulados. Os resíduos brutos foram fracionados em solução de NaOH 1M (FP 1) e NaOH 4 M (FP 4) e, após a hidrólise do amido com α – amilase, as frações polissacarídicas FP 1 e FP 4 foram precipitadas com etanol. As lectinas purificadas em colunas de Sephadex G-50 foram submetidas a cromatografias de afinidade em colunas destas frações. A fração FP 1 de *Canavalia brasiliensis* apresentou maior capacidade de reter lectinas que as demais frações. As análises das frações FP 1 e FP 4 por cromatografia de camada delgada e cromatografia líquido-gasosa revelaram predominância do monossacarídeo glucose e menores proporções de galactose, arabinose, manose e xilose. Como as lectinas da subtribo Diocleinae apresentam alto grau de homologia estrutural, as frações insolúveis podem servir como excelentes matrizes cromatográficas para o isolamento de outras lectinas com a mesma especificidade. Os receptores lectínicos solúveis extraídos das farinhas em solução de NaCl 0,15M foram isolados por cromatografia seqüenciada em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose-lectina. Por SDS-PAGE, revelaram-se como duas bandas protéicas de massas moleculares aparentes de 66 kDa e 70 kDa.

Conforme os resultados, as lectinas de representantes da subtribo Diocleinae interagem com receptores insolúveis, e com receptores solúveis, presentes no extrato salino.

ABSTRACT

The lectins constitute a special class of protein with the special propriety of reversibly and specifically interacting with carbohydrates and glycoconjugates. This lectins ability suggests a relevant *in vivo* biological role, but this hypothesis demands the existence of endogenous receptors. The intensification of research on receptors molecules may help to elucidate the lectins biological functions.

The lectins from the sub-tribe Diocleinae shows a high degree of structural similarity. These lectins are D-glucose and D-mannose ligands, interacting with a variety of simple carbohydrates and complex glicans. Insoluble receptors for these lectins were obtained from the seeds of *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia floribunda*. The seeds were triturated and the flour obtained submitted extraction in solution of 0,15M NaCl. The crude residues of this extraction were reticulated with epichlorohydrin, and the lectins were isolated by affinity chromatography in columns of the crude residues. The crude residues were fractionated in 1M NaOH (FP 1) and 4 M NaOH (FP 4). The FP 1 and FP 4 fractions were precipitated with ethanol, after the treatment of the starch with α - amylase. The purified lectins in columns of Sephadex G-50 were submitted to affinity chromatography in these fractions. *Canavalia brasiliensis* fraction FP1 showed the highest capacity to interact with lectins. The analysis of the FP 1 and FP 4 fractions by thin-layer chromatography and liquid-gaseous chromatography showed predominance of the glucose and lower quantities of galactose, arabinose, mannose and xylose monosaccharide. As the Diocleinae sub-tribe lectins present high structural homology, the insoluble fractions can serve as excellent affinity chromatographic matrices for the isolation of other lectins with the same compatible specificity. The soluble lectin receptors were extracted from the seeds flours in saline (0,15M NaCl) and isolated by sequenced chromatography in Sephadex G-50 and Sepharose-lectin columns. The SDS-PAGE showed as two protein bands of 66 kDa and 70 kDa.

The results shows that the Diocleinae sub-tribe lectins interact with insoluble receptors present in the seed residues, and with soluble receptors in the saline extract.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.0. Lectinas: Considerações gerais

A primeira constatação da ocorrência de lectinas na natureza deu-se há mais de cem anos, quando Stillmark (1888) observou que o extrato de sementes de *Ricinus communis* era capaz de aglutinar eritrócitos humanos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). A partir de então, muitas outras lectinas vêm sendo detectadas em tecidos vegetais, animais e até em bactérias e fungos. Durante esse período, inúmeras pesquisas foram desenvolvidas no que se refere à ocorrência, distribuição, isolamento e caracterização biológica e várias propriedades funcionais destas proteínas (SHARON; LIS, 2004).

A etimologia da palavra lectina proveniente do latim *legere*, que significa selecionar, deriva da propriedade de reconhecer e interagir seletivamente com estruturas glicídicas de diferentes fontes (BOYD; SHAPLEIGH, 1954) e, indiscutivelmente, é esta a característica peculiar que torna uno este grande e heterogêneo grupo de biomoléculas protéicas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Do ponto de vista estrutural, as lectinas são proteínas heterogêneas com grande variabilidade de tamanhos e organização molecular (LIS; SHARON, 1998). Na tentativa de melhor conceituá-las, muitas definições lhes foram atribuídas ao longo dos anos. Atualmente, a definição mais aceita pela comunidade científica é a de Peumans e Van Damme (1995). Segundo eles, lectinas são todas as proteínas ou glicoproteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico, e que se ligam reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos.

Largamente encontradas na maioria dos organismos, desde microorganismos a vegetais e animais, as lectinas são, então, proteínas ubíquas. No entanto, a ocorrência de lectinas vegetais tem sido a mais documentada (SINGH *et al.*, 1999) sendo detectadas em diferentes órgãos e tecidos vegetais. No reino Plantae as famílias Leguminosae e Solanaceae possuem o maior número de lectinas já isoladas (VAN DAMME *et al.*, 1998). Particularmente, lectinas da família das leguminosas são as mais pesquisadas, e constituem um grande grupo de proteínas estruturalmente semelhantes, porém com especificidades distintas para carboidratos.

Dentre as várias propriedades das lectinas, as características dessas proteínas que são importantes para a ligação a carboidrato têm sido investigadas com grande ênfase nas

últimas décadas. Originalmente, acreditou-se que a especificidade das lectinas por açúcares poderia ser expressa em termo dos monossacarídeos que melhor inibissem a reação de aglutinação. Com base nessa observação, Makela (1957) classificou as lectinas de acordo com sua especificidade por monossacarídeos (VAN DAMME, *et al.*, 1998), entretanto, sabe-se hoje que a especificidade das lectinas por carboidratos pode ser bem fina, pois, na realidade, as lectinas interagem na natureza com oligossacarídeos e não com açúcares simples (RAMOS, *et al.*, 1996a).

Objetivando uma classificação mais aprimorada dessas biomoléculas, Peumans e Van Damme (1995) subdividiram as lectinas vegetais em três classes distintas. Com base em suas estruturas globais, elas foram então classificadas como merolectinas, hololectinas e quimerolectinas.

As merolectinas são proteínas pequenas de uma única cadeia polipeptídica, constituídas por um único domínio de ligação a carboidrato e, devido a suas naturezas monovalentes, são incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como exemplo típico de merolectina, cita-se a heveína, uma proteína ligante a quitina derivada do látex de *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJIS *et al.*, 1991).

As hololectinas, também chamadas de hemaglutininas, apresentam pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos que podem ser idênticos ou muito homólogos e capazes de interagir com o mesmo açúcar ou com açúcares estruturalmente semelhantes. A maioria das lectinas vegetais pertence a esse grupo e por apresentarem múltiplos sítios ligantes, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (VAN DAMME *et al.*, 1998).

O terceiro subgrupo, o das quimerolectinas, compreende as proteínas que possuem um ou mais domínios ligantes a carboidratos e um outro domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica bem definida. De acordo com o número de sítios de ligação, as quimerolectinas podem ainda comportar-se como hololectinas ou merolectinas. Como exemplos de quimerolectinas, citam-se as quitinases tipo I e as RIPs tipo II (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Van Damme *et al.*, (1998) definiram ainda as superlectinas, como um tipo especial das quimerolectinas. Essas lectinas possuem pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos estruturalmente distintos que reconhecem açúcares de estruturas também diferentes. Uma lectina representante desse grupo é a lectina de bulbo de tulipa com dois domínios, sendo um domínio N-terminal específico para manose e um segundo domínio específico para N-acetil-galactosamina.

Um quinto grupo de lectinas foi sugerido por Monteiro-Moreira (2002). Denominado de multilectinas, essas proteínas possuem sítios idênticos de ligação a carboidratos distintos. A figura 1 apresenta, de forma esquemática, os cinco tipos de lectinas acima descritos.

As lectinas também foram classificadas em cinco grupos de lectinas de acordo com as suas especificidades de ligação a monossacarídeos distintos. Assim, elas são agrupadas como ligantes de manose/glucose (I), galactose/N-acetil-galactosamina (II), N-acetil-glucosamina (III), fucose (IV), e ácido N-acetil-neuramínico (V) (SHARON; LIS, 1989).

Um passo inicial no estudo de lectinas é a separação destas, de outras proteínas e de demais biomoléculas presentes no material biológico. A purificação de lectinas de diferentes fontes envolve a preparação de extratos em solução salina ou solução tampão, seguida de cromatografias. Quando necessária, uma pré-extração de lipídios com solvente orgânico é realizada. Muitos extratos contendo atividade lectínica são também parcialmente purificados por diálises exaustivas, fracionamento dependente de pH ou fracionamento salino (MOREIRA, 1998).

Os métodos convencionais para a purificação protéica utilizam-se das diversas características específicas exibidas pelas proteínas, como carga elétrica, tamanho molecular, hidrofobicidade e solubilidade (HARRIS; ANGAL, 1995). A purificação por cromatografia de afinidade, especificamente, baseia-se nas propriedades biológicas dessas macromoléculas: seletividade, alta afinidade de reconhecimento, e interação reversível com outras moléculas (PARIKH; CUATRECASAS, 1985). Ressalta-se que, por ser o método mais eficaz, a cromatografia de afinidade é atualmente a metodologia mais utilizada para o isolamento de lectinas (MOREIRA, 1998).

Apesar da disponibilidade comercial de diferentes matrizes utilizadas para cromatografia de afinidade de lectinas, como a agarose e dextranas, o desenvolvimento e o uso de matrizes eficientes e mais baratas que as comerciais se intensificaram nos últimos anos. Diversos glicoconjugados naturais têm sido utilizados com esse propósito (MOREIRA *et al.*, 1998).

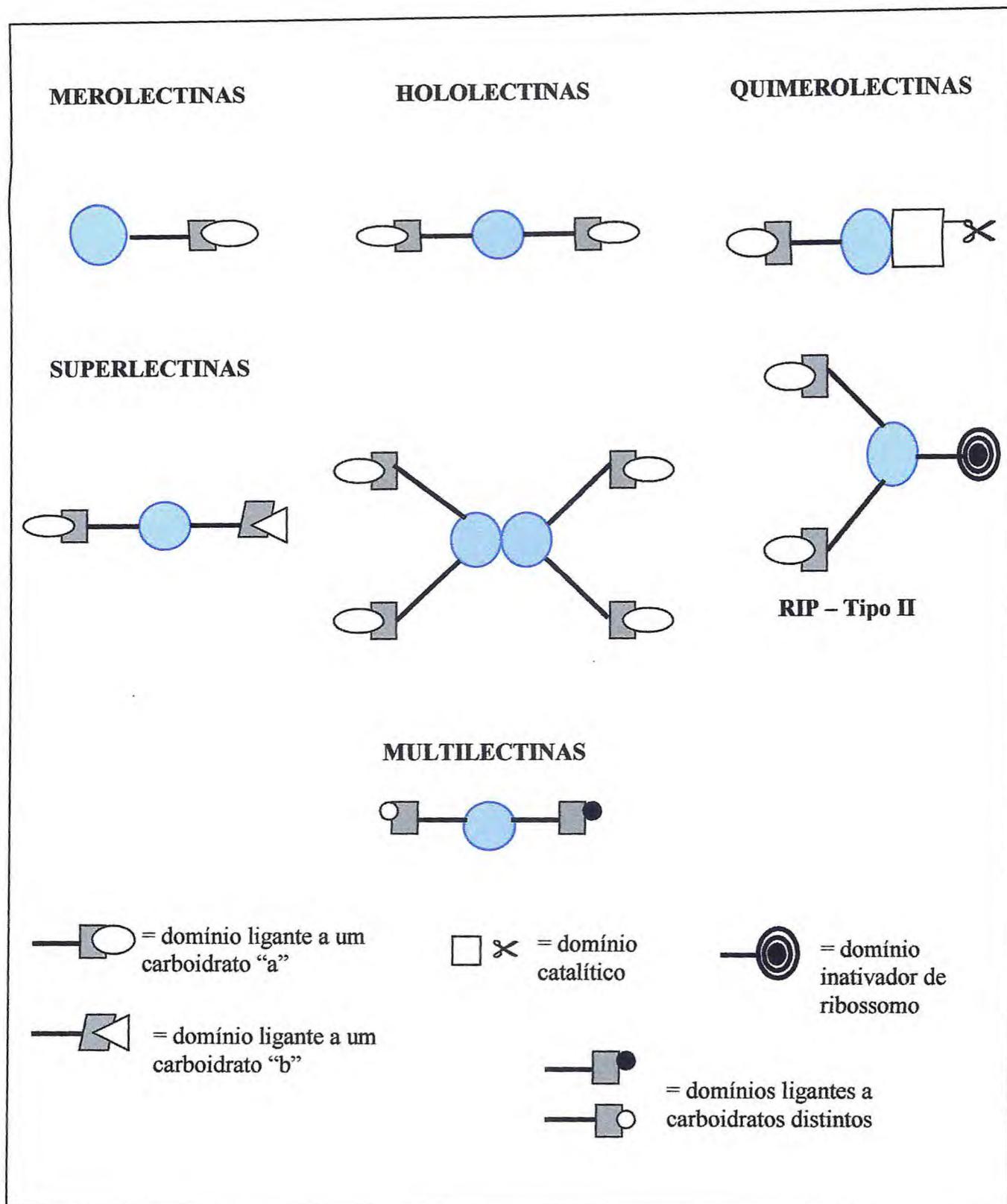


FIGURA 1. Representação esquemática dos tipos de lectinas vegetais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas, multilectinas e superlectinas. Fonte: PEUMANS; VAN DAMME, (1995), MONTEIRO-MOREIRA (2002).

Diversos polissacarídeos naturais foram caracterizados e reticulados por ligações cruzadas por tratamento com epícloridrina, fornecendo matrizes cromatográficas para isolamento de lectinas (TEIXEIRA, 2005, 2001; LIMA, 2002; BRAGA, 2001; GARROS-ROSA, 2000; MATOS, 2000; TAVARES, 1998).

Como consequência da propriedade de ligação a carboidratos, a aplicabilidade das lectinas vegetais vem oferecendo inúmeras vantagens em diversas áreas biológicas. O uso de lectinas como ferramentas biotecnológicas tem sido cada vez mais ampliado (MOREIRA, 1998). Nas áreas clínicas, o seu uso teve um desenvolvimento significativo, como em estudos de diferenciação celular (PINTO *et al.*, 1999), estudos histoquímicos de células e tecidos (YAMAMOTO *et al.*, 2000), tipagem de células sanguíneas (LIS; SHARON, 1986), estimulação linfocitária (BARJA-FIDALGO, 1999; BENTO *et al.*, 1993), entre outras aplicações.

Apesar da grande quantidade de lectinas já isoladas, pouco se sabe sobre suas funções endógenas (SHARON; LIS, 2004). Considerando-se o fato das lectinas estarem amplamente distribuídas no reino vegetal, além de serem sintetizadas e mobilizadas em estágios específicos do desenvolvimento das plantas (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; ETZLER, 1985), algumas funções endógenas para essas biomoléculas têm sido propostas, na tentativa de relacionar a propriedade de reconhecer e interagir com açúcares, com seus possíveis papéis na planta.

Diante da constatação de que lectinas de leguminosas são sempre encontradas nos corpos protéicos, a primeira função fisiológica atribuída a elas seria a de proteínas de reserva; pelo fato das plantas conterem quantidade apreciável de sacarose e seus derivados, as lectinas de sementes poderiam ainda estar envolvidas com a fixação e transporte desses carboidratos na planta (LIENER *et al.*, 1986). Elas estariam também relacionadas com o empacotamento das proteínas de reserva, desde que várias lectinas de leguminosas testadas demonstraram habilidade para interagir com proteínas de reserva de suas respectivas plantas (EINHOFF *et al.*, 1986).

Como são componentes de membranas, as lectinas poderiam desempenhar alguma função no crescimento e alongação da parede celular. A presença de lectinas associadas não covalentemente com a parede celular de plantas faz supor que elas possam ligar componentes na forma de ligações cruzadas e, à medida que essas ligações são clivadas e novas ligações são estabelecidas por intermédio das auxinas, as lectinas poderiam assim estar envolvidas no processo de alongação celular (HAASZ *et al.*, 1981).

Devido ao fato das lectinas serem encontradas também em partes vegetativas das plantas como folhas, caules, cascas de árvores e raízes, pode-se supor que a sua função esteja diretamente relacionada com sua localização na planta. Com base em evidências experimentais, destacam-se ainda duas possíveis funções das lectinas: como mediadores da simbiose entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes de leguminosas e como agentes de defesa de plantas contra patógenos e predadores, principalmente insetos e fungos (CHRISPEELS; RAIKEL, 1991).

1.1. Lectinas de leguminosas

O primeiro registro histórico da ocorrência de lectinas de leguminosas data de 1890 com o relato de Power e Cambier sobre o isolamento de uma lectina tóxica extraída da casca da árvore de *Robinia pseudoacacia* (KOCOUREK, 1986). Na seqüência, Landsteiner e Raubitschek (1907), foram os pioneiros a relatarem sobre a ocorrência de lectinas não tóxicas em sementes das leguminosas *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris* e *Vicia sativa* (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Deve-se ressaltar que a maioria dos trabalhos pioneiros nos campos da bioquímica, fisiologia e biologia molecular de lectinas vegetais foi realizada com lectinas de leguminosas. A lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) foi a primeira lectina purificada e cristalizada por Summer e Howell (1936); sua estrutura primária e tridimensional também foram as primeiras a serem resolvidas, sendo essa lectina a mais investigada até a atualidade (DEREWENDA *et al.*, 1989).

As subseqüentes descobertas de várias lectinas em sementes de leguminosas tiveram um grande impacto para o desenvolvimento da lectinologia. Este grupo de lectinas tem sido objeto de intensas pesquisas, talvez devido à larga distribuição e a fácil obtenção de um grande número de espécies pertencentes à família.

Nas leguminosas, as lectinas são sintetizadas durante o desenvolvimento da semente, atingindo os níveis máximos na semente quiescente. Muitas sementes de leguminosas têm duas ou mais lectinas diferentes localizadas nos corpos protéicos dos cotilédones; essas proteínas chegam a representar cerca de 1 a 10% do conteúdo protéico solúvel total da semente (ETZLER, 1985).

Lectinas de leguminosas também são encontradas em diferentes tecidos vegetativos. Embora em concentrações muito pequenas em folhas, caules, raízes e nódulos,

as lectinas encontradas em cascas de algumas árvores como *Robinia pseudoacacia*, *Maackia amurensis* e *Sophora japonica* chegam a representar de 20 a 50% das proteínas solúveis totais (BABA *et al.*, 1991; NSIMBA-LUBAKI; PEUMANNNS, 1986). Nestes tecidos, também podem ser detectadas diferentes lectinas expressas por diferentes genes (VAN DAMME *et al.*, 1997, 1995; YAMAMOTO *et al.*, 1997, 1994).

Várias lectinas de leguminosas tiveram suas seqüências aminoacídicas determinadas. Essas lectinas são formadas por protômeros de aproximadamente 30 kDa. A maioria deles consistindo de uma cadeia polipeptídica com cerca de 250 resíduos de aminoácidos. Alguns protômeros, entretanto, são parcialmente clivados em dois polipeptídeos menores, formando lectinas de cadeia dupla, sendo possível a ocorrência de oito diferentes formas moleculares, com a formação de dímeros e tetrâmeros, a partir da combinação de protômeros de uma e duas cadeias, glicosiladas ou não (VAN DAMME *et al.*, 1997). Enquanto a maioria das lectinas da tribo *Vicieae* (PSA, LCA, LoLI) são dímeros divalentes, muitas outras lectinas de leguminosas formam estruturas tetraméricas com quatro regiões que se ligam a monossacarídeos (BANERJEE *et al.*, 1996, 1994).

As lectinas dessa família dividem um alto grau de similaridade na seqüência. Elas contêm regiões altamente conservadas, como os aminoácidos do sítio de interação a carboidratos envolvidos na interação com os cátions divalentes Ca^{++} e Mn^{++} , que são íons essenciais para as suas atividades biológicas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Basicamente todos os protômeros de lectinas de leguminosas que consistem de uma cadeia (ConA, GS-IV, PNA, SBA, PHA-L, VVL-B4) ou de duas cadeias (lectinas da tribo *Vicieae*, excetuando-se a isolectina VVL-B4 de *Vicia villosa*) mostram conformação tridimensionais muito parecidas. Eles consistem de uma face curva formada por sete folhas β -pregueadas e uma face plana posterior de seis folhas β -pregueadas interconectadas por voltas e *loops* (RICHARDSON, 1981).

Os protômeros de lectinas de leguminosas também contêm uma cavidade hidrofóbica responsável por ligações não-covalentes com a auxina. Composta essencialmente por aminoácidos hidrofóbicos: valina, fenilalanina, leucina e isoleucina, essa região hidrofóbica possui características estruturais altamente conservadas em todas as lectinas de leguminosas (ROUGÉ *et al.*, 1987).

Muitas lectinas de leguminosas são glicosiladas, e cada protômero pode apresentar uma ou duas cadeias glicanas distintas. Os principais carboidratos encontrados são N-acetil-glicosamina, L-fucose e xilose (SHARON; LIS, 1989). A lectina de soja possui uma

cadeia glicídica rica em manose (NAGAI; YAMAGUCHI, 1993) enquanto a PHA, a hemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, dispõe de uma cadeia glicana rica em manose e de um tipo mais complexo de glicano, ambos encontrados em um mesmo protômero (STURM *et al.*, 1992; STURM; CHRISPEELS, 1986).

Apesar de suas seqüências aminoacídicas serem bastante similares, as lectinas dessa família diferem com relação a suas especificidades finas de interação a carboidratos (CAVADA *et al.*, 1993). Essas lectinas possuem o mais largo espectro de especificidade a monossacarídeos, podendo interagir com açúcares simples ou com estruturas glicanas complexas presentes nas glicoproteínas (WEIS; DRICKAMER, 1996; DRICKAMER, 1995).

Através da co-cristalização da lectina de *Lathyrus ochrus* com D-manose e D-glucose, Bourne *et al.*, (1990), mostraram que poucos resíduos de aminoácidos localizados nos quatro *loops* da região superior da cavidade monomérica são os responsáveis pela especificidade de reconhecimento desta lectina pelos açúcares simples e seus derivados mais complexos. Os resíduos Asp-81, Gly-99, Asn-125, Gly-29, Ala-30 e Glu-31 estabelecem sete pontes de hidrogênio com as hidroxilas O3, O4, O5 e O6 do açúcar simples, enquanto um resíduo aromático de Phe-123 favorece uma interação hidrofóbica com o anel piranose do açúcar. Outras observações similares foram feitas com outras lectinas da família.

O sítio de interação a carboidratos da lectina PSA foi analisado por mutagênese dirigida. O estudo mostrou que os resíduos Asp-81 e Asn-125 são extremamente importantes para a interação com o carboidrato (VAN EIJSDEN *et al.*, 1992). Quando substituídos todos os aminoácidos dos sítios por outros de características diferentes, resultou na incapacidade da lectina interagir com qualquer açúcar simples, demonstrando a importância dos aminoácidos que compõe o sítio (VAN EIJSDEN *et al.*, 1994).

Ramos (1996a) comprovou que a disposição tridimensional dos aminoácidos de lectinas de Diocleinae envolvidos no sítio de interação a carboidrato, determinada por modelamento e superposição, concorda totalmente com aquela determinada para a Con A por difração de raios X.

O alto grau de homologia entre as seqüências de aminoácidos de lectinas de leguminosas permite que as mesmas sejam úteis como marcadores moleculares para a classificação botânica de espécies vegetais similares, em estudos de quimiotaxonomia. Alguns desses trabalhos envolvendo lectinas abordam similaridades bioquímicas, enquanto

outros abordam aspectos estruturais (AINOUZ *et al.*, 1995; MOREIRA *et al.*, 1995; BARRE *et al.*, 1994).

1.1.1. Lectinas da subtribo Diocleinae

A subtribo Diocleinae pertence à família Leguminosae, compreendendo 13 gêneros: *Calopogonium*, *Camptosema*, *Canavalia*, *Cratyli*, *Cleobulia*, *Collaea*, *Cymbosema*, *Dioclea*, *Galactia*, *Herpyza*, *Luzonia*, *Macropsychnanthus* e *Pachyhizus* (POLHILL *et al.*, 1981), entretanto, apenas alguns gêneros se destacam com relação a lectinas já detectadas e isoladas (*Canavalia*, *Cratyli*, *Calopogonium*, *Dioclea*, *Galactia* e *Herpyza*).

Extraída da semente de *Canavalia ensiformis*, a ConA é constituída por uma cadeia polipeptídica de 237 resíduos aminoácídicos (cadeia α), arranjada em duas folhas β -antiparalelas, interconectadas por β -turn, loops e poucos segmentos desordenados, a qual se associa formando uma estrutura oligomérica (dímero/tetrâmero) com 4 subunidades de aproximadamente 25 kDa (VIJAYAN; CHANDRA, 1999).

A cadeia α fragmentada origina dois fragmentos denominados de β e γ (CHRISPEELS *et al.*, 1986). Os fragmentos β e γ são mantidos juntos por ligações não covalentes e formam um protômero cuja estrutura tridimensional é essencialmente a mesma da subunidade formada pela cadeia polipeptídica íntegra, sem descontinuidade na estrutura primária (SHARON; LIS, 1989).

A ConA apresenta uma estrutura multimérica com interconverções na forma dímero-tetrâmero dependente de pH. Seu sítio de ligação a carboidrato é formado por uma leve depressão sobre a superfície do monômero feita por quatro loops próximos da superfície superior da proteína. Cada subunidade possui um único sítio de ligação a unidades de D-glucose/D-manose dependentes de íons metálicos Ca^{++} e Mn^{++} como estabilizadores da interação lectina – carboidrato, auxiliando o correto posicionamento dos resíduos de aminoácidos do sítio de interação a carboidratos (BECKER *et al.*, 1975). Naismith *et al.*, (1994), demonstraram que a cavidade de cada monômero é formada pelos mesmos aminoácidos Tyr-12, Asn-14, Leu-99, Tyr-100, Asp-208, e Arg-228, dentre outros (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Os mecanismos de reconhecimento a carboidrato envolvem diversos fatores estruturais, porém, a formação de pontes de hidrogênio entre o açúcar e a proteína é uma

característica essencial da interação lectina-carboidrato. As interações hidrofóbicas e van der Waals, estabelecidas entre prótons e carbonos alifáticos a média distância, representam uma significativa região apolar, apesar dos açúcares serem altamente polares e solvatados. As interações entre essa região do açúcar e aminoácidos aromáticos da proteína fornecem uma significativa energia à interação lectina-açúcar. Esse tipo de interação foi observado em todos os complexos cristalinos envolvendo uma lectina e seu receptor (DRICKAMER, 1995).

1.1.2. Características bioquímicas das lectinas da subtribo Diocleinae

Desde o primeiro relato de isolamento da lectina de ConA, várias lectinas pertencentes a outras espécies de Diocleinae, com propriedades similares foram purificadas e parcialmente caracterizadas. Todas as lectinas de Diocleinae têm estruturas multiméricas formadas por monômeros idênticos de 25,5 kDa, com característico equilíbrio dímero/tetrâmero pH dependente (MOREIRA; CAVADA, 1984). Essas lectinas possuem elevada afinidade por hemácias de coelho e, como são metaloproteínas, cada subunidade requer os íons Ca^{++} e Mn^{++} em suas cavidades hidrofóbicas, para exibirem completa atividade biológica (MOREIRA *et al.*, 1996).

De acordo com suas propriedades químicas e físico-químicas, as lectinas de Diocleinae mostram um elevado grau de similaridade (CAVADA *et al.*, 1996c; RAMOS *et al.*, 1996a; MOREIRA *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 1991), com suas estruturas revelando alto grau de homologia nas seqüências aminoacídicas e arranjos tridimensionais (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 1996b; NAISMITH *et al.*, 1994; NAISMITH *et al.*, 1993). Os aminoácidos que compõem o sítio de interação a monossacarídeos na ConA foram totalmente conservados em lectinas de Diocleinae, independentemente do gênero (NOGUEIRA, 1999; RAMOS, *et al.*, 1996b; CAVADA *et al.*, 1993).

A reatividade de várias lectinas dessa subtribo já foi detalhadamente investigada por Ramos *et al.*, (1996a), através da inibição da atividade hemaglutinante por uma ampla variedade de carboidratos simples e complexos e por glicoproteínas. Ele comprovou que, embora possuam afinidade pelos monossacarídeos D-glucose e D-manose, essas lectinas interagem com uma variedade de carboidratos simples, reconhecendo também estruturas glicanas complexas como aquelas presentes em glicoproteínas.

Apesar do reconhecido envolvimento do sítio de ligação a carboidratos em suas atividades biológicas, seus receptores celulares ainda não são completamente conhecidos. Porém, o fato dessas lectinas apresentarem grande afinidade pelo trissacarídeo 3,6-di-O-(α -D-manopiranosil)-D-manose, localizado na região central dos oligossacarídeos de todas as glicoproteínas N-ligadas, sugere que os receptores envolvidos devem apresentar esse trissacarídeo como parte comum de sua estrutura mais ampla (DAM *et al.*, 2000; DAM *et al.*, 1998).

Exemplos de estruturas tridimensionais entre lectina e glicanos complexos presentes na literatura mostram que as lectinas possuem larga flexibilidade de reconhecimento, podendo interagir com receptores de diferentes características estruturais. Uma simples unidade monossacarídica pertencente a estruturas glicídicas mais complexas é reconhecida pela lectina e complexa-se com seu sítio ativo, enquanto outras interações não covalentes são estabelecidas na interface entre as duas moléculas (interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio) estabilizando o complexo lectina-ligante (BOURNE *et al.*, 1994; BOURNE *et al.*, 1992).

Conforme estudos cristalográficos, a configuração da hidroxila ligada ao carbono C⁴ seria a hidroxila responsável pela especificidade apresentada por lectinas glucose/manose ligantes e galactose/galactosamina ligantes (SHARON; LIS, 1990).

1.1.3. Propriedades biológicas das lectinas da subtribo Diocleinae

As propriedades biológicas de lectinas da subtribo Diocleinae têm sido objeto de muitos estudos, contudo as pesquisas se intensificaram a partir da década de noventa.

Apesar de exibirem a mesma especificidade por D-glucose, D-manose e seus derivados, e de serem estruturalmente muito semelhantes, as lectinas da subtribo Diocleinae apresentam diferenças significativas quanto à especificidade fina com relação a um mesmo ligante glicídico refletindo numa grande variabilidade de propriedades biológicas (CALVETE *et al.*, 2000; SANZ-APARICIO *et al.*, 1997; RAMOS *et al.*, 1996a; 1996b).

Como ferramentas potenciais no estudo de vários sistemas biológicos, as lectinas de sementes dessa subtribo têm demonstrado estimular macrófagos e a migração de leucócitos em resposta a administração intraperitoneal em camundongos; as lectinas de *C. brasiliensis* e *Dioclea grandiflora* mostraram ser mais potentes que a ConA (RODRIGUEZ *et al.*,

1992). A administração *in vivo* da lectina de *Canavalia brasiliensis* em ratos infectados por *Leishmania amazonensis* conferiu resistência à proliferação da doença (BARRALNETTO *et al.*, 1996). BENTO *et al.*, (1993) compararam a capacidade das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Canavalia ensiformis* e *Dioclea grandiflora* em induzir o edema de pata e a migração de células peritoneais em ratos, evidenciando um maior efeito pró-inflamatório com relação às lectinas de *C. brasiliensis* e *D. grandiflora*. Dentre outras atividades biológicas, as lectinas de Diocleinae inibem a formação de edema de pata e migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, causados por carragenina, sendo o efeito antiinflamatório inibido quando as lectinas foram administradas juntamente com seus açúcares inibitórios específicos, sugerindo o envolvimento do domínio lectínico nesse efeito (ALENCAR *et al.*, 1999).

1.1.4. Lectinas dos gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*

As lectinas dos gêneros *Canavalia*, *Dioclea* e *Cratylia* podem ser isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. Essas lectinas apresentam o mesmo perfil eletroforético em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, caracterizado por três grupos de bandas protéicas com massas moleculares aparentes em torno de 20 a 30 kDa para a cadeia α , 16 a 18 para o fragmento β e entre 12 e 13 kDa para o fragmento γ (CARRINGTON *et al.*, 1985).

O seqüenciamento N-terminal da cadeia α e dos fragmentos β e γ isolados de lectinas dos gêneros *Dioclea*, *Canavalia* e *Cratylia* revelou que os últimos correspondem às metades N- e C- terminais da cadeia α (GRANGEIRO *et al.*, 1997a; AINOUS *et al.*, 1987; CARRINGTON *et al.*, 1985; RICHARDSON *et al.*, 1984). Esses fragmentos são característicos das lectinas das espécies de Diocleinae, como *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983), *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA; CAVADA, 1984), *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991), *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS *et al.*, 1991), *Dioclea rostrata* (CAVADA *et al.*, 1996a), *Dioclea virgata* (CAVADA *et al.*, 1996b), *Dioclea violácea* (MOREIRA *et al.*, 1996), *Canavalia bonariensis* (CAVADA *et al.*, 1996c). Assim, os eventos pós-traducionais que ocorrem durante a biossíntese da ConA, e que explicam a origem dos fragmentos dessa e de outras lectinas homólogas, parecem ser característicos do mecanismo biossintético das lectinas dessa subtribo (GRANGEIRO *et al.*, 1997a).

As lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altíssima* já foram isoladas e caracterizadas (MOREIRA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1991; MOREIRA; CAVADA, 1984) como hololectinas não glicoprotéicas.

As sementes de *Cratylia floribunda* possuem uma lectina que, à semelhança das demais lectinas da subtribo Diocleinae, em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, apresenta uma cadeia α de massa molecular aparente de 29-30 kDa, e os dois fragmentos da cadeia principal, com massas moleculares de 16-18 kDa (β) e 12-13 kDa (γ), respectivamente. O fragmento β é visualizado como duas bandas protéicas que migram muito próximas uma da outra, sendo denominadas de bandas β_1 (banda de mobilidade mais lenta) e β_2 (banda de maior mobilidade) (GRANGEIRO *et al.*, 1997b). Os mesmos resultados foram também obtidos na ausência do agente redutor 2-mercaptoetanol (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

Por filtração em gel de Superose 12 HR, a pH neutro, a lectina de *Dioclea altíssima* exibe uma massa molecular aparente de 49,3 kDa. Por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes são encontradas três bandas protéicas, com Mr de 9, 14 e 26 kDa (MOREIRA *et al.*, 1997). A composição aminoacídica desta lectina é caracterizada por elevado teor de ácido aspártico e serina, sendo bastante similar as outras lectinas de Diocleinae. A seqüência N-terminal dos primeiros sete resíduos (Ala, Asp, Thr, Ile/Leu, Val, Ala, Val) se mostrou idêntica quando comparada com as diversas lectinas da subtribo (CAVADA *et al.*, 1993).

Grangeiro *et al.*, (1997a), através de clonagem do cDNA, seqüenciamento aminoacídico e espectrometria de massa, determinaram a estrutura primária da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr). Assim como a ConA, essa lectina dispõe de 237 resíduos de aminoácidos formando um monômero. Os monômeros de ConBr associam-se para formar dímeros e tetrâmeros em diferentes valores de pH. As isolectinas de ConBr e ConA diferem apenas nos resíduos nas posições 58, 70 e 96. Segundo os mesmos autores, a substituição de glicina na posição 58 não forma a ponte de hidrogênio existente no tetrâmero de ConA entre os resíduos Asp 58 da subunidade A e Ser 62 da subunidade C. Como conseqüência, a ConBr adota uma estrutura quaternária mais aberta que o tetrâmero de ConA.

Essas diferenças na estrutura quaternária possivelmente explicam as peculiares e distintas propriedades biológicas da ConBr com relação às demais lectinas, apesar da alta homologia estrutural com a ConA (NOGUEIRA, 1999).

1. 2. Interação entre lectinas e polissacarídeos

O interesse nas interações entre proteínas e carboidratos tem aumentado consideravelmente na última década. As primeiras investigações entre proteínas e açúcares foram negligenciadas em detrimento de investigações de peptídeos, DNA e suas interações um com o outro. Isto porque se pensava que os aminoácidos e nucleotídeos fossem as primeiras letras do alfabeto da vida. No entanto, devido às inúmeras possibilidades de ligações entre as unidades, os carboidratos possuem um potencial mais alto para codificar informações que nucleotídeos e aminoácidos (NEUMANN, 2004).

Em decorrência do crescente isolamento de muitas lectinas, ficou evidente que muitas das lectinas vegetais exibem diferenças óbvias com respeito à sua atividade biológica, a qual está intimamente relacionada com a estrutura de seus receptores glicanos. Logo, a necessidade para uma determinação detalhada da ligação específica carboidrato-lectina foi reconhecida, e vários grupos de pesquisa voltaram seus esforços para a elucidação da especificidade fina de diferentes lectinas. Como resultado, informações detalhadas estão agora disponíveis no que diz respeito a especificidade para açúcar de muitas lectinas de plantas, que são usadas como investigador molecular e/ou proteínas ativas biologicamente (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

É evidente que a principal característica dessas proteínas, a de reconhecer e de ligar-se reversível e especificamente a estruturas glicídicas presentes em glicoproteínas, glicolipídios e/ou polissacarídeos, deve ter relevância *in vivo* (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; SHARON; LIS, 1989; ETZLER, 1985). Essa hipótese pressupõe a existência de ligantes glicídicos nos tecidos dos quais sejam derivadas ou em outras células e glicoconjugados com os quais estejam destinadas a interagir (MOREIRA, 1998).

Embora muitas funções específicas tenham sido propostas, as funções endógenas para as lectinas ainda é motivo de especulação pela comunidade científica. Sabe-se, entretanto, que lectinas e glicoconjugados estão comumente presentes na superfície celular. Somado ao reconhecimento científico de que os carboidratos têm um enorme potencial para codificar informações biológicas, evidencia-se que essas moléculas estão eminentemente disponíveis para atuar no reconhecimento celular (LIS; SHARON, 1998).

Nas últimas décadas, alguns receptores endógenos de lectinas descritos aparentemente como glicoproteínas simples foram isolados de sementes de *Pisum sativum*, *Canavalia ensiformis*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* e *Ricinus communis* (GANSERA *et al.*,

1979), *Vicia sativa* (GEBAUER *et al.*, 1979). Tais receptores não são eritroaglutinantes e suas ligações às lectinas podem ser inibidas pelos açúcares para os quais a lectina apresenta afinidade. Resultados semelhantes foram obtidos por Bowles e Marcus (1981) em sementes de soja (*Glycine max*) e em feijão de porco (*Canavalia ensiformis*), embora em pequenas quantidades quando comparadas ao teor de lectinas dessas sementes. Em *Dioclea grandiflora* (MOREIRA *et al.*, 1983) e *Dioclea sclerocarpa* (TAVARES, 2002; HORTA-BARROS *et al.*, 1987) também foram detectados receptores para as lectinas destas sementes.

TAVARES (2002), ao isolar a lectina de *Dioclea sclerocarpa*, constatou a presença de receptores endógenos insolúveis no resíduo bruto dessas sementes. O mesmo autor detectou receptores solúveis no extrato protéico salino das sementes de *Dioclea sclerocarpa* capazes de interagir com lectinas de *Dioclea altíssima* a partir da cromatografia do extrato salino em coluna de Sepharose 4B com essas lectinas imobilizadas.

RAMOS *et al.*, (2002), evidenciaram a interação da lectina de semente de *Cratylia floribunda* com moléculas solúveis presentes nas frações protéicas obtidas da farinha da mesma semente, sugerindo que esta interação deve ser mediada pelo sítio de ligante a carboidrato na lectina.

TEIXEIRA (2005) encontrou e caracterizou uma galactoxiloglucana de parede celular de cotilédones de sementes de *Mucuna sloanei*. Este polímero interagiu *in vitro* com a lectina do mesmo tecido vegetal, tratando-se, pois, de um par lectina-receptor endógeno.

Recentemente, Ina *et al.*, (2005), extraíram e purificaram uma lectina e seu possível receptor endógeno de tegumento de árvores de *Robinia pseudoacacia*. A lectina purificada se auto-agrega, precipitando após a remoção de N-acetilglucosamina/manose, porém a lectina se torna solúvel na presença deste ligante glicídico. Conforme os mesmos autores, a lectina coexiste e interage com a lectina ligante a GalNac/Gal, seu receptor endógeno potencial.

Apenas com a intensificação de pesquisas a cerca dessas moléculas receptoras e seus mecanismos de interação com as lectinas, esses mecanismos das funções biológicas endógenas propostas para as lectinas poderão ser detalhadamente investigados e elucidados.

1.3. Parede celular vegetal

Uma característica peculiar que distingue as células vegetais das células animais é a presença de paredes celulares vegetais, estruturas heterogêneas complexas e dinâmicas, compostas principalmente por polissacarídeos de massas molares elevadas, proteínas glicosiladas e lignina (SOMERVILLE *et al.*, 2004).

Em modelos mais recentes de parede celular, esta seria formada por três domínios interligados, porém independentes (celulose-hemicelulose, pectinas e proteínas). Cada um destes domínios possui componentes típicos e exercem diferentes funções na parede. (CARPITA; GIBEAUT, 1993; McCANN; ROBERTS, 1991). Nesses modelos, os três domínios formam um compósito com características semelhantes a um cristal líquido (ROLAND *et al.*, 1992).

Estrutura exterior à membrana citoplasmática, a parede celular confere às células a sua forma e funcionalidade e, aos tecidos, uma estrutura que permite às plantas atingirem estatura e consistência diversas. Além de conferir força mecânica, forma e tamanho à maioria das células vegetais, a parede celular exerce funções essenciais no controle da expansão celular, modulação do tráfego de substâncias que entram e saem da célula, além de participação no controle do potencial de água da célula, e na interação das células vegetais com simbiontes e patógenos (SOMERVILLE *et al.*, 2004; CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Com composição química predominantemente glicídica (90%), os arranjos moleculares das próprias paredes e dos polímeros constituintes das paredes celulares vegetais são variáveis conforme a espécie de planta, entre os tecidos de uma única espécie, entre células individuais de um mesmo órgão e até em regiões da parede de uma única célula (REITER, 2002; CARPITA; GIBEAUT, 1993), mas, em geral, é possível definir quais os polímeros mais abundantes em um tecido ou órgão.

Essa diversidade na composição e estrutura das paredes nos vários tipos de células vegetais pode ser o reflexo das necessidades distintas destas em elasticidade, mobilidade de moléculas na parede ou equilíbrio na sinalização de patógenos (SOMERVILLE *et al.*, 2004).

Apesar dessa diversidade morfológica, as paredes celulares comumente são classificadas em dois tipos principais: as paredes primárias e as paredes secundárias.

1.3.1. Parede celular primária

As paredes primárias são formadas por células em crescimento. Essas células vegetais jovens, capazes de se dividirem e se alongar, possuem uma parede celular muito fina (0,1-1µm em corte transversal) (REID, 1997). Mecanicamente estável e suficientemente extensível, a parede primária é capaz de permitir a expansão da célula, evitando que esta se rompa pela pressão exercida pelos protoplastos (REITER, 2002).

A parede primária é composta de aproximadamente 25% de celulose, 25% de hemiceluloses e 35% de pectinas, com 1 a 8% de proteínas estruturais (TAIZ; ZEIGER, 2002). Os polímeros de hemicelulose interligam-se às microfibrilas em uma matriz aparentemente amorfa de pectina (SALISBURY; ROSS, 1992).

Muitas proteínas que compõem a parede celular são proteínas estruturais (CASSAB, 1998), enquanto outras, como as enzimas, participam ativamente das alterações da parede (DARLEY *et al.*, 2001). A parede celular primária dispõe de enzimas como a celulose sintetase, hidrolases, e oxidases, necessárias durante o crescimento secundário para a síntese, reorganização e inserção de novos polímeros, nos processos de espessamento e lignificação da parede (HATFIELD, 1989).

Ao longo do ciclo de vida da célula, a parede celular modifica a sua estrutura e composição. A parede primária forma-se a partir da divisão celular e aumenta de área durante a expansão celular, mantendo sua espessura por contínua biossíntese dos constituintes da parede (REID, 1997; CARPITA; GIBEAUT, 1993). Durante o crescimento celular, os polissacarídeos estruturais se rearranjam de modo passivo, como resultado da pressão de *turgor* interna, e ativamente no controle da intensidade e direção do crescimento celular conferindo resistência mecânica à parede (REID, 1997).

Nesse processo ocorre um rearranjo dos polímeros da parede envolvendo possivelmente a clivagem enzimática de ligações entre os polímeros e quebra de fragmentos que resultam no afrouxamento da parede. Em contrapartida, a síntese e inserção de novos polímeros e a reconexão dos fragmentos confere nova forma às paredes primárias tornando-as menos extensíveis (PROSEUS *et al.*, 1999).

Estudos estruturais de paredes celulares primárias de um grande número de espécies vegetais, principalmente em angiospermas, revelam a existência de dois tipos de paredes primárias: parede celular primária do tipo I e parede celular primária do tipo II (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Os dois tipos de paredes primárias distinguem-se fundamentalmente nas proporções relativas e nas estruturas moleculares das hemiceluloses que as constituem.

Paredes celulares primárias do tipo I são encontradas principalmente em dicotiledôneas. Essas paredes são constituídas por uma rede de microfibrilas de celulose, as quais estão envolvidas e interconectadas pelas cadeias de xiloglucanos (FRY, 2003). Outros polissacarídeos hemicelulósicos também podem ser encontrados, como gluco e galactoglucomananos, galactomananos, (1→3)β-D-glucanos e glucuronoarabinoxilanos, porém em menores quantidades. Toda a rede de polissacarídeos encontra-se embebida em uma matriz de polissacarídeos pécticos (YOKOYAMA; NISHITANI, 2004; WILLATS *et al.*, 2001).

As paredes celulares tipo II, típicas das monocotiledôneas são mais ricas em polímeros do domínio celulose-hemicelulose. Os xilanos são as frações hemicelulósicas predominantes nessas paredes, enquanto que os xiloglucanos perfazem a minoria, juntamente com unidades de glucanos unidos por ligações β-(1→3), (1→4). As pectinas também se encontram presentes, porém em menor teor do que nas paredes do tipo I (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

1.3.2. Parede celular secundária

A divisão da célula vegetal envolve a biogênese e integração de novas paredes. Após a cessação do crescimento celular, paredes celulares secundárias são adicionadas no lado interno da parede celular primária, conferindo estabilidade mecânica a alguns tipos celulares como as que compõem o esclerênquima e componentes vasculares do xilema e da madeira, exercendo função de suporte, proteção e condução (REITER, 2002).

A parede celular secundária é uma espessa camada depositada junto à membrana citoplasmática, constituindo cerca de 90% da parede celular em espessura. Cada subcamada depositada possui uma orientação própria das microfibrilas de celulose entre as quais se encontram localizadas porções de lignina e hemiceluloses. Essa parede começa a ser formada no momento em que cessa a expansão da parede celular primária; deposita-se na forma de um cilindro, em torno da parede primária pré-existente (EMONS; MULDER, 2000).

As paredes secundárias podem se tornar altamente especializadas em estrutura e composição, refletindo o estado diferenciado da célula (TAIZ; ZEIGER, 2002). A parede

secundária de cotilédones e endospermas de algumas sementes não contém ou contém celulose em baixa quantidade, mas, em compensação, apresenta polissacarídeos não celulósicos em sua constituição. As fibras de algodão e as células de esclerídeos e tecidos vasculares, cujas paredes secundárias se tornam muito espessas, são compostas predominantemente de celulose (REID, 1997).

Além de rígidas, as paredes celulares secundárias são extremamente duras devido à deposição de polímeros de lignina, compostos aromáticos fenilpropanóides, que se dá após o completo espessamento da parede celular secundária, sendo a lignificação normalmente seguida pela morte celular e pelo desaparecimento dos conteúdos citoplasmáticos (SOMERVILLE, *et al.*, 2004; REID, 1997). Por microscopia eletrônica, essas paredes revelam-se como uma malha de polissacarídeos de massas molares elevadas, proteínas altamente glicosiladas, e lignina (CARPITA; GIBEAUT, 1993).

Na maturação, a parede celular secundária de células rijas contém cerca de 30% de celulose, 30% de glucoronoxilanos e 40% de lignina (REIS; VIAN, 2004). Durante este período, as mudanças que ocorrem incluem a perda hídrica da matriz da parede celular (SELVENDRAN, 1983) e alterações no conteúdo dos polissacarídeos da parede primária (CARPITA, 1983).

A organização estrutural da celulose e hemiceluloses nessas paredes parece ser mais aprimorada do que na parede primária (TAIZ; ZEIGER, 2002; HATFIELD, 1989). Muitas paredes celulares secundárias são construídas de acordo com uma organização helicoidal regular em torno da parede primária pré-existente (REIS; VIAN, 2004; ROLAND *et al.*, 1987).

Reis *et al.*, (1991), observaram através de estudos *in vitro* que associação de componentes de glucoronoxilanos e microfibrilas de celulose orienta a formação de paredes secundárias, direcionando as microfibrilas de celulose em um arranjo helicoidal. Durante a lignificação, os glucoronoxilanos parecem atuar como estruturas anfitriãs para a inserção e polimerização dos precursores de lignina na parede celular (REIS; VIAN, 2004).

1.3.3. Polissacarídeos estruturais de parede celular

Os carboidratos compreendem o mais abundante grupo de compostos encontrados na natureza. Nos vegetais, eles estão presentes freqüentemente como oligo e polissacarídeos, formados por policondensação de monossacarídeos ou seus derivados,

ligados glicosidicamente através da eliminação de água entre duas moléculas adjacentes (NELSON; COX, 2000).

Os polissacarídeos são polímeros de dez ou mais unidades monossacarídicas, podendo assumir as mais diversas formas e desempenhar diferentes funções, como componente estrutural, desempenhada pela celulose nas paredes celulares e os glicoconjugados nas membranas celulares; como material de reserva, desempenhado principalmente pelo amido de sementes e tubérculos; e a função de defesa contra predadores e/ou estresse hídrico, desempenhada pelas gomas exsudadas e endospermicas, respectivamente (NELSON; COX, 2000).

A maioria do carbono fixado fotossinteticamente é incorporada aos carboidratos das paredes celulares vegetais. De grande importância para a nutrição humana e animal, além das indústrias têxteis e de papéis, os polissacarídeos formam a fonte mais abundante de biomassa e de energia renovável terrestre (REITER, 2002; REID, 1997).

As paredes celulares de folhas de espécies de dicotiledôneas como *Arabidopsis* contêm as três maiores classes de polissacarídeos estruturais estudados: celulose, hemiceluloses e pectinas (SOMERVILLE *et al.*, 2004).

As frações pécticas formam uma fase gel hidratada na qual está implantada a rede celulose – hemiceluloses existente na parede celular primária de dicotiledôneas e monocotiledôneas não-gramíneas. Representam cerca de 30% do peso seco total da parede celular (POPPER; FRY, 2005; ABDEL-MASSIH *et al.*, 2003; THOMPSON; FRY, 2000). Ao formarem malhas de poligalacturonano por ligações α -(1→4), dão sustentação à parede celular enquanto as extensinas, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, proporcionam extensibilidade ao arranjo estrutural (FRY, 1986; GOODWIN; MERCER, 1983).

A pectina é composta por polissacarídeos complexos bastante solúveis em água. São ricos em galactose, arabinose e ácido galacturônico, o que lhes confere um caráter ácido. Por serem carregadas, estas moléculas são capazes de alterar o ambiente iônico ao qual a célula está exposta, modificando a difusão de íons na parede. Este domínio é o principal elemento regulador da porosidade da parede, afetando assim o crescimento celular e acesso de enzimas a glucanos para afrouxar a parede celular; no preenchimento hidrofílico, as pectinas impedem a agregação e o colapso da rede de celulose (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Os polissacarídeos pécticos que contêm altas proporções de unidades de ácido D-galacturônico unidos por ligações α -(1→4) metil-esterificados são denominados de

homogalacturonanos (HGA). Existem dois tipos de HGAs estruturalmente modificados: xilogalacturonanos e o ramnogalacturonano II (CARPITA; McCANN, 2000).

O ramnogalacturonano I (RG-I) consiste em um polímero de ácido galacturônico, interrompido por unidades de ramnose, aos quais podem se ligar polímeros neutros (galactanos e arabinanos), geralmente de cadeia curta. O RG-II é considerado uma das moléculas mais complexas da natureza e é pouco abundante. Na rede péctica, íons de cálcio servem como reticulantes entre os grupos de ácido carboxílico desesterificado particularmente nos domínios HGA e RG-I, enquanto pontes de éter borato reticulam os domínios de RG-II (YOKOYAMA; NISHITANI, 2004; WILLATS *et al.*, 2001).

Enquanto o domínio pectínico determina o grau de porosidade e participa do sistema de defesa celular (TAIZ; ZEIGER, 2002), o domínio celulose/hemicelulose tem a função de coordenar a forma celular, pois as hemiceluloses interagem especificamente com a celulose, orientando suas microfibrilas durante o processo de biossíntese e determinando também a orientação do crescimento (REID, 1997).

A celulose consiste de polímeros lineares compostos de aproximadamente 2×10^3 a 25×10^3 unidades de D-glucose unidas por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (KUGA; BROWN, 1991). Todas as unidades de glucose têm uma rotação de 180°, resultando em celobiose como unidade estrutural repetida das cadeias de celulose (BROWN *et al.*, 1996). As microfibrilas de celulose, unidades fundamentais de celulose, são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e a predisposição estrutural da parede celular (TAIZ; ZEIGER, 2002).

As microfibrilas são sintetizadas na membrana plasmática. Cerca de 30 a 36 fibras de celulose são interligadas por pontes de hidrogênio juntamente com forças de van der Waals, resultando em estruturas cristalinas insolúveis, relativamente inacessíveis ao ataque enzimático (SOMERVILLE *et al.*, 2004; TAIZ; ZEIGER, 2002; BROWN *et al.*, 1996).

As hemiceluloses constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos que se ligam com firmeza à parede. Esses polímeros de açúcares neutros ou ácidos são sintetizados no Complexo de Golgi e variam em quantidade e composição de acordo com o vegetal e tecidos constituintes. São constituídas por xilanos, mananos e galactanos, ou por combinações destes, como xiloglucanos, arabinogalactanos e galactomananos. Em sua maioria são estruturas ramificadas, formando malhas interligadas com as microfibrilas celulósicas através de pontes de hidrogênio (REID, 1997) e ligações tipo éster e éter com os monômeros de lignina em paredes secundárias (JUNG, 1989).

A maioria das hemiceluloses que ocorrem em plantas terrestres é constituída essencialmente por cadeias lineares formadas principalmente por D-xilose, D-glucose, L-arabinose, D-manose, D-galactose, 4-O-metilglucurônico e, em menor representatividade, L-fucose, L-ramnose e vários açúcares neutros O-metilados (MARASCHIN *et al.*, 2000).

Enquanto as pectinas são extraídas com soluções aquosas contendo quelantes, as ligações covalentes com os polissacarídeos pécticos e não covalentes com a celulose dificultam a extração das hemiceluloses, sendo essas geralmente extraídas com bases relativamente fortes. A celulose compõe o resíduo obtido após a extração da pectina e hemiceluloses (REID, 1985, 1997).

1.3.3.1 Polissacarídeos hemicelulósicos

Os xilanos são polissacarídeos hemicelulósicos de larga ocorrência nas plantas terrestres e em algumas algas marinhas. Eles são o principal componente das hemiceluloses da parede primária de monocotiledôneas. Com cadeias similares a de celulose, os xilanos são constituídos por unidades de xilose unidas por ligações β -D-(1 \rightarrow 4). De maneira geral, são insolúveis em água e solúveis em soluções alcalinas (BANERJI *et al.*, 1986; SILVA *et al.*, 1986).

Xilanos lineares neutros são raros. A maioria dos xilanos descritos contém ácido glucurônico e 4-O-metilglucurônico. Xilanos acídicos foram identificados em *Cyperus papyrus*, *Arachis hypogaea* e *Glycine max*, *Caianus caian* (SWAMY; SALIMATH, 1991).

Em paredes celulares de monocotiledôneas comelinóides, os glucuronarabinoxilanos são os principais polímeros interligados. Nestes, unidades de α -L-Ara formam ramificações na posição O-3, enquanto unidades de ácido glucurônico ligam-se na posição O-2 das unidades de xilose da cadeia principal. Em dicotiledôneas, as unidades de α -L-Ara formam ramificações tanto na posição O-2, quanto na posição O-3 (CARPITA; McCANN, 2000).

Os xiloglucanos aparecem em grandes quantidades em cotilédones de semente de leguminosas da subfamília Caesalpinoidae. Estes são assim denominados por serem constituídos de uma cadeia principal de unidades de glucose unidas por ligações β -D-(1 \rightarrow 4), com ramificações por ligações α -(1 \rightarrow 6) de unidades de D-xilopiranosídeos. Essas ramificações podem ser substituídas por β -D-Gal ou α -L-Ara, dependendo da espécie onde

é encontrado e, em alguns casos, a galactose pode ser substituída com α -L-Fuc (CARPITA; McCANN, 2000).

As relações estrutura-função desses polissacarídeos dependem de modificações em suas estruturas finas, considerando-se a posição de unidades de galactose no polímero. Os xiloglucanos de parede celular de sementes possuem propriedades hidrodinâmicas muito próximas às dos galactomananos, o que sugere funções similares a estes, referentes ao controle de embebição de água e xeroproteção (BUCKERIDGE *et al.*, 2000a).

Os xiloglucanos devem ter, certamente, papel importante no alongamento da parede celular primária de vegetais devido a sua posição ultraestrutural como polissacarídeo ligante entre microfibrilas de celulose e polímeros pécnicos (SOMERVILLE *et al.*, 2004; CHAMBAT *et al.*, 1984).

Recentemente, Teixeira (2005) identificou e caracterizou um xiloglucano de sementes de *Mucuna sloanei* capaz de interagir com a lectina isolada dessa semente.

Nos vegetais, os mananos formam um grupo de polissacarídeos presente principalmente em parede celular ou em endospermas de sementes de algumas espécies de Palmae, Umbeliferae e Leguminosae. Em endospermas de sementes de espécies de monocotiledôneas, são encontrados, por exemplo, em *Phoenix dactylifera* e *Phytelephas macrocarpa*, e em dicotiledôneas, em sementes de *Coffea arábica* (REID, 1985).

Os mananos são subdivididos em mananos puros, glucomananos e galactomananos. Caracterizam-se por serem formados por uma cadeia principal de unidades de manose, podendo apresentar unidades intercaladas de D-glucose ou ramificações com α -(1→6) galactose (BUCKERIDGE *et al.*, 2000a).

Por mananos puros definem-se os polímeros contendo mais de 90% de manose formando uma cadeia linear do tipo β -(1→4) manopiranosil, com até 10% das unidades de manose podendo ser substituídas por ramificações com ligações α -(1→6) de unidades de galactose. Nessas condições ou abaixo desse percentual, os mananos tornam-se insolúveis e precipitam rapidamente em soluções aquosas (DEA *et al.*, 1986).

As relações estrutura-função dos mananos são definidas pelos seus graus de ramificações. Quanto menos ramificado maior é a indicação de que a função biológica esteja relacionada com a dureza e proteção do embrião. Enquanto que o maior grau de ramificação confere maior solubilidade ao polissacarídeo e, por conseguinte, maior participação deste em funções hídricas (BUCKERIDGE *et al.*, 2000b).

Estruturalmente relacionados com os mananos, porém com maior grau de ramificação com a galactose e de ocorrência típica em endosperma de sementes de Leguminosas, os galactomananos também são encontrados em sementes de espécies de outras famílias como Palmae, Compositae e Convolvulaceae (GUZMÁN; HERNANDEZ, 1982).

Os galactomananos são compostos por uma cadeia linear de unidades de manose unidas por ligações β -(1→4) à qual, unidades de galactose estão unidas por ligações glicosídicas α -(1→6), como grupo lateral. Os galactomananos diferem um dos outros na proporção manose:galactose e pela distribuição das unidades de galactose ao longo da cadeia de manose, o que causa variações em sua solubilidade, susceptibilidade à degradação enzimática e interação molecular (DEA; MORRISON, 1975). Por desempenharem suas funções durante fases distintas do crescimento e desenvolvimento das plantas, esses polímeros são considerados moléculas multifuncionais. Em não-leguminosas, as funções de dureza e proteção do embrião são mais evidentes (BUCKERIDGE *et al.*, 2000b).

Quando reticulados com epiclorigrina, galactomananos de *Adenantha pavonina* (MOREIRA *et al.*, 1998), *Parkinsonia aculeata* (GARROS-ROSA, 2000), *Leucaena leucocephala* (SESHAGIRIRAO, *et al.*, 2005) formam géis capazes de isolar lectinas galactose ligantes por cromatografia de afinidade.

A identificação de um galactano como polissacarídeo distinto foi realizada por Hirst *et al.*, em 1947, em sementes de lupino (*Lupinus albus*). Baseado na determinação estrutural, o polissacarídeo era constituído por ligações β -(1→4) de unidades de D-galactose (BUCKERIDGE *et al.*, 2000b).

AlKaisey; Wilkie (1992), após estudo extensivo, identificaram dois tipos de galactanos em quatro espécies de lupino, sendo um constituído por ligações β -(1→3)- β -(1→6) com algumas ligações β -(1→4), e o outro, mais freqüente, composto por ligações β -(1→4) com ramificações de L-arabinofuranose a cada 16-21 unidades da cadeia principal.

Como uma cadeia lateral de pectina, o galactano pode ser visto como um polissacarídeo da parede celular primária que foi ampliado e adaptado para o armazenamento. Pode-se caracterizar o galactano como molécula de múltiplas funções, sendo tanto de reserva quanto um importante elemento na expansão cotiledonar durante o desenvolvimento (BUCKERIDGE *et al.*, 2000a).

Os arabinogalactanos, juntamente com arabinanos de parede celular podem formar cadeias laterais dos polissacarídeos pécticos RG-I. Os arabinogalactanos são classificados em arabinogalactano I (AG-I) e arabinogalactanos II (AG-II). O primeiro é constituído por uma cadeia do tipo β -(1 \rightarrow 4)-D-Gal; unidades de L-arabinofuranose encontram-se ligadas ao O-3 dos resíduos galactosil (RIDLEY *et al.*, 2001).

Os arabinogalactanos II (AG-II) encontram-se fortemente associados a proteínas e ainda não está claro se esses polissacarídeos compõem o complexo de frações pécticas. Os AG-II são polissacarídeos do tipo β -(1 \rightarrow 3)-D-Gal, com pequenas cadeias laterais com ligações α -(1 \rightarrow 6) de unidades de L-arabinofuranose e β -(1 \rightarrow 6) de unidades de galactose (RIDLEY *et al.*, 2001). As unidades galactosil das cadeias laterais podem ser substituídas por unidades de L-arabinofuranose α -(1 \rightarrow 3) (GASPAR *et al.*, 2001).

Os arabinanos consistem de uma cadeia principal de unidades α -L-arabinofuranosídicas unidas por ligação do tipo 1 \rightarrow 5, altamente ramificados, podendo conter substituições simples ou dupla nas posições 2 e/ou 3, por unidades de α -L-arabinose (RIDLEY *et al.*, 2001). Normalmente associados aos polissacarídeos pécticos, a presença desses polímeros foi constatada em espécies das famílias Cruciferae, Papilionaceae, Rutaceae, Rhamnaceae, Myrtaceae, Salicaceae, Rosaceae e Leguminoseae. (ZAVADZKI-BAGGIO *et al.*, 1992). A figura 2 representa as estruturas químicas de polissacarídeos hemicelulósicos de larga ocorrência em sementes.

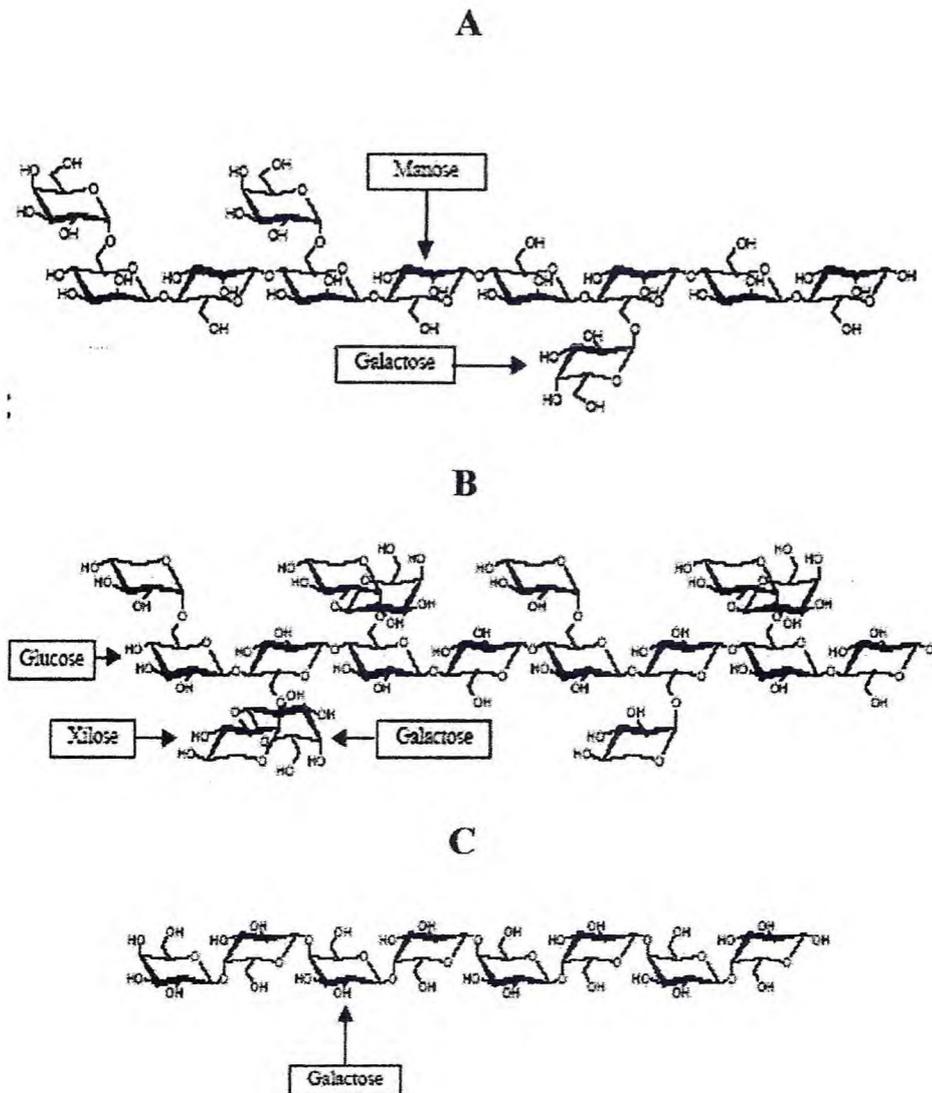


FIGURA 2. Estruturas químicas de polissacarídeos hemicelulósicos que ocorrem em sementes. (A) Galactomanano; (B) Xiloglucano e (C) Galactanos. Em (A) o polissacarídeo é denominado galactomanano quando a ramificação com resíduos de galactose for superior a 10% , do contrário, denomina-se manano. Em (B), os xiloglucanos apresentam variações apenas no grau de galactosilação, enquanto a proporção glucose/xilose é fixa. O galactano representado em (C) esquematiza o galactano mais frequente, composto por ligações β -(1 \rightarrow 4). Fonte: BUCKERIDGE *et al.*, 2000b.

1.3.4. Polissacarídeos de reserva de plantas

O acúmulo de grandes quantidades de compostos nos endospermas e cotilédones de suas sementes é um recurso que as Angiospermas dispõem para se adaptar aos mais variados ambientes (BUCKERIDGE; REID, 1996). Dentre essas substâncias, o amido, os frutanos e os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) são os principais polissacarídeos de reserva de plantas. Após iniciada a germinação, estas substâncias são mobilizadas e seus produtos usados para diversos fins como fontes de energia e produção de proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos e lipídeos, matéria-prima indispensável para a construção de novas células e tecidos (BUCKERIDGE, 2000b).

Muitos polímeros de carboidratos foram selecionados durante a evolução. O amido é o mais difundido, seguido pelos frutanos e os polissacarídeos de parede celular (BUCKERIDGE *et al.*, 2000b).

As características peculiares de cada um dos principais polissacarídeos de reserva são convenientes para o metabolismo celular a determinadas situações. Como compostos de reserva, o amido e os frutanos, formados por unidades de glucose e frutose, respectivamente, são prontamente utilizados pelo metabolismo vegetal (BUCKERIDGE *et al.*, 2000a).

O amido é o mais abundante polissacarídeo de reserva presente em sementes, caule, folhas, frutos e órgãos subterrâneos. Trata-se de um polímero constituído por monômeros de glucose dispostos tridimensionalmente, em estruturas cristalinas denominadas grânulos. O amido ocorre em duas formas: a amilose e a amilopectina (BEWLEY; BLACK, 1994). A primeira consiste de cadeias lineares de unidades de D-glucose unidas por ligações α -(1→4) dispostas em α -hélice geralmente linear. Quase não há ramificações nesta estrutura e uma simples cadeia pode conter milhares de unidades de glucose. A amilopectina consiste em cadeias lineares de altas massas molares formadas por ligações glicosídicas α -(1→4) entre as sucessivas unidades de glucose. As ramificações α -(1→6) a cada 24 – 30 unidades de glucose tornam a molécula de amilopectina altamente ramificada (BUCKERIDGE *et al.*, 2004; NELSON; COX, 2000).

A insolubilidade e alta compactação do amido nos amiloplastos conferem inatividade osmótica ao polímero. A sua mobilização ocorre por hidrólise ou por mecanismos que envolvem a fosforilação direta de unidades de glucose terminais (BUCKERIDGE *et al.*, 2000a; BEWLEY; BLACK, 1994).

Sendo insolúvel, o amido é menos ativo osmoticamente que os frutanos e sua maior compactação também o faz menos reativo. Os frutanos são altamente solúveis e estão localizados nas folhas, raízes, caules e órgãos subterrâneos. A compactação dos frutanos em menor grau o faz mais utilizado no controle do potencial osmótico das células (BIELESKI, 1993).

A hidrólise enzimática do amido requer uma etapa inicial de gelatinização para intumescer os grânulos de amido e torná-los suscetíveis à ação das enzimas (SARIKAYA *et al.*, 2000). Existem cinco grupos de enzimas envolvidas na hidrólise do amido: as endo e as exo amilases, as desramificadoras, as isomerases e as ciclodextrinas glicosiltransferases (MALDONADO; LOPEZ, 1995). As duas mais comuns enzimas utilizadas para a hidrólise do amido são a glucoamilase e a α -amilase. As ligações lineares α -(1→4) são clivadas pela α -amilase enquanto a glucoamilase cliva ambas ligações α -(1→4) e as ramificações α -(1→6) presentes no amido. O produto final da ação da glucoamilase são moléculas de glucose (AGGARWAL; DOLLIMORE, 1998).

De acordo com a estrutura química dos polissacarídeos de reserva de parede celular, esses polímeros têm sido usualmente classificados em: mananos, xiloglucanos e galactanos (BUCKERIDGE; REID, 1996; REID, 1985).

Em sementes, os principais fenômenos durante o período final de maturação são as atividades de biossíntese e deposição dos polissacarídeos na parede celular. O período de quiescência é interrompido pela embebição de água, processo em que os PRPCs exercem função importante (BUCKERIDGE; DIETRICH, 1996).

Após a germinação, inicia-se a mobilização dos PRPCs com a síntese e/ou processamento das suas enzimas de hidrólise. A mobilização culmina na produção de uma grande quantidade de açúcares livres, parte deles acumulada como amido transitório que será posteriormente degradado pela plântula em crescimento (TINÉ, 1997).

Enquanto o amido desempenha exclusiva função de reserva, os frutanos e os PRPC têm outras funções paralelas. Os frutanos participam do controle osmótico e os PRPC estão associados à dureza (mananos em endospermas de sementes de palmeiras, tomate e alface), relações hídricas (xiloglucanos em cotilédones e galactomananos em endospermas de sementes de leguminosas) e no controle da expansão celular (galactanos nos cotilédones de lupino e, em menor proporção, em sementes de feijão e soja) (BUCKERIDGE; REID, 1996; BUCKERIDGE *et al.*, 2000a).

1.4. Descrição botânica, morfologia e distribuição geográfica das plantas

1.4.1. *Canavalia brasiliensis*

Conhecida popularmente como feijão de porco brasileiro e feijão-bravo do Ceará, a *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. pertence à família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae.

Canavalia brasiliensis (sinônimos *Canavalia amazonica* Piper, *C. caribaea* Urb., *C. fendleri* Piper, *C. leptophylla*, *C. mexicana* Piper, *C. panamensis* Piper, *C. paraguayensis* Piper, *C. prolifica* Piper ex Ricker) tem larga distribuição, prevalecendo, porém, na América Central, México e Caribe, Paraguai, Norte da Argentina e Nordeste do Brasil (SAUER, 1964).

Essa leguminosa herbácea possui folhas trifoliadas e ovais (12-15 cm de comprimento x 8-10 cm de largura) e inflorescências axilares, com flores púrpuras medindo cerca de 2-2,5 cm de comprimento. As vagens glabras (12-20 cm de comprimento x 1 cm de largura) têm colorações que variam de marrom a marrom escuro e contêm uma média de 12 sementes. As sementes de *Canavalia brasiliensis* apresentam colorações que variam de marrom-claro a marrom, com aproximadamente 11 mm de comprimento por 8 mm de largura, com um hilo preto de 6 mm de comprimento (figura 3) (ALVES *et al.*, 1989).

Geralmente, a *Canavalia brasiliensis* é utilizada para controle da erosão e enriquecimento mineral do solo para as culturas de outras espécies. Na América Central, é também empregada como forragem para melhorar o valor da pastagem. Nas regiões mais pobres do Nordeste do Brasil, suas sementes são utilizadas como alimento em épocas de seca (OLIVEIRA *et al.*, 1994).

As sementes contêm um teor protéico de 31,9% (GOMES *et al.*, 1988) a 41,6% (MAYWORM *et al.*, 1998), 52,3% de carboidratos, 12,3% de fibra bruta, 2,8% de minerais e 1,2% de lipídios (MAYWORM *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 1988). Cerca de 20% do conteúdo protéico correspondem à lectina ConBr (OLIVEIRA, *et al.*, 1994; GOMES *et al.*, 1988).

A



B



FIGURA 3. Planta (A) e sementes (B) de *Canavalia brasiliensis*.

1.4.2. *Cratylia floribunda*

O gênero *Cratylia* pertence à família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Papilonoideae, tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae. A *Cratylia floribunda* Benth (sinônimos *Cratylia argentea* Desv., *Cratylia nitens* Benth., *Dioclea argentea* Desv. e *Dioclea floribunda*) originária da América do Sul é a espécie de maior distribuição neste Continente. No Brasil, se estende da região Norte e Nordeste até os Estados de Mato Grosso e Goiás (QUEIROZ; CORADÍN, 1995).

Conhecida popularmente como camaratuba (LEWIS, 1987), a *Cratylia floribunda* é uma trepadeira arbustiva, profusamente ramificada, com elevada resistência a períodos de seca, podendo alcançar até 3 metros de altura. Suas folhas são trifoliadas e a inflorescência nodulosa contém de seis a nove flores por nódulo. As flores são lilás e as vagens (20 cm de comprimento x 1–3 cm de largura) contêm de 4 a 8 sementes (QUEIROZ; CORADÍN, 1995). É uma espécie forrageira de alto teor protéico (21 a 28%), com digestibilidade relativamente alta (53 a 65%) e ausência de taninos condensados (ARGEL, 1995; LASCANO, 1995; PIZARRO *et al.*, 1995; SOUSA; OLIVEIRA, 1995) (figura 4).

As sementes de *Cratylia floribunda* possuem formas lenticular, circular e elíptica (QUEIROZ; CORADÍN, 1995), apresentando tegumento fino com colorações que variam do marrom ao marrom-escuro, medindo cerca de 9 mm de comprimento por 9 mm de largura, e 1, 5 cm de diâmetro.

A



B



FIGURA 4. Planta (A) e sementes (B) de *Cratylia floribunda*

1.4.3. *Dioclea altissima*

Dioclea altissima (Velloso) Rock emend Maxwell var. *megacarpa* é uma leguminosa tropical pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae e subgênero *Pachylobium*.

Conhecida popularmente como mucuna ou olho de boi (MAXWELL, 1969), tem larga distribuição, sendo encontrada no Caribe, América Central e países da América do Sul (DU PUY, *et al.*, 2002; MAXWELL, 1969).

A planta, uma trepadeira arbustiva, chega a atingir altura máxima de 7,5 a 10 m, apresentando ramificações no meio do caule piloso, e suas folhas carnosas possuem pelos glandulosos (HUEFS, 1995).

As sementes de *Dioclea altissima* são semelhantes às sementes de *Dioclea violácea* e *Dioclea sclerocarpa* em massa, tamanho e forma (TAVARES, 2002). As sementes de *Dioclea altissima* possuem um hilo correspondendo em média a 62% do perímetro da semente e apresentam, em média, 3,0 cm de comprimento, 2,1 cm de largura, e peso médio de 12,1 g (figura 5).

Similares às demais representantes do subgênero *Pachylobium*, as sementes de *Dioclea altissima* são exalbuminadas, ou seja, não possuem endosperma, com suas reservas contidas nos cotilédones. Quando destegumentadas, as sementes contêm 23,5% de proteína bruta (3,76% de N₂) na matéria seca (MOREIRA *et al.*, 1995), superior ao percentual encontrado para a farinha de sementes de *Dioclea sclerocarpa* (17,68%).

O teor de umidade nas sementes de leguminosas varia em torno de 10%. Nos cotilédones de *Dioclea altissima* esse percentual é de 9,8%. Os valores do teor lipídico e de cinzas são de 2,69% e 2,84%, respectivamente. O teor de carboidratos, por diferença, é de 68,38% (TAVARES, 2002).

A



B



FIGURA 5. Planta (A) e sementes (B) de *Dioclea altissima*.

JUSTIFICATIVA

2. Justificativa

As lectinas constituem uma classe especial de proteínas com a propriedade particular de interagir específica e reversivelmente com carboidratos e glicoconjugados sem alterar a estrutura covalente dos mesmos.

Já foi demonstrado por Tavares (2002) que a lectina isolada da semente de *Dioclea sclerocarpa* interage com o resíduo desta semente. Teixeira (2005) isolou uma nova lectina galactose ligante de sementes de *Mucuna sloanei* capaz de interagir com um receptor que também foi isolado e caracterizado como um xiloglucano de parede celular.

Foi também mostrado que sementes de diferentes espécies da subtribo Diocleinae possuem lectinas com propriedades biológicas semelhantes à de *D. sclerocarpa* e que também podem interagir com a matriz preparada com resíduo dessa semente, embora em menor quantidade.

Sendo as lectinas da subtribo Diocleinae proteínas estruturalmente semelhantes, e, considerando a provável relevância da interação lectina-receptor endógeno na elucidação das funções das lectinas nas plantas, buscou-se neste trabalho identificar e caracterizar receptores endógenos das lectinas de sementes de *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*.

HIPÓTESE DO TRABALHO

3. Hipótese do trabalho

A constatação de que uma lectina extraída da semente de *Dioclea sclerocarpa* interage reversivelmente com estruturas glicídicas solúveis e insolúveis presentes na própria semente inspirou a hipótese de que as sementes de outras espécies representantes da subtribo Diocleinae também possuiriam moléculas receptoras endógenas solúveis e insolúveis capazes de interagir com as lectinas dessas sementes.

**ESTRATÉGIAS
EXPERIMENTAIS**

4. Estratégias experimentais

Os seguintes procedimentos experimentais foram realizados, objetivando-se confirmar a hipótese suscitada:

- ◆ Obtenção das farinhas das sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea altíssima* e *Cratylia floribunda*;
- ◆ Extração das proteínas das farinhas das espécies utilizadas;
- ◆ Fracionamento do resíduo bruto obtido das extrações protéicas;
- ◆ Reticulação com epícloridrina do resíduo bruto;
- ◆ Isolamento das lectinas das espécies estudadas por cromatografias de afinidade em colunas de resíduos brutos reticulados e não reticulados;
- ◆ Determinação do teor de retenção lectínica das frações polissacarídicas insolúveis;
- ◆ Cromatografia dos polissacarídeos insolúveis em camada delgada;
- ◆ Cromatografia líquida-gasosa acoplada à espectrometria de massa (G.L.C. -MS) das frações polissacarídicas insolúveis;
- ◆ Preparação de matrizes de afinidade por imobilização das lectinas das sementes, em gel de Sepharose-CNBr;
- ◆ Isolamento dos receptores solúveis por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose 4B-lectina;
- ◆ Cromatografia seqüenciada dos receptores solúveis em colunas de afinidade;
- ◆ Determinação quantitativa dos carboidratos dos receptores solúveis;
- ◆ Determinação do poder inibitório dos receptores solúveis sobre a atividade hemaglutinante das lectinas;

MATERIAL

5. Material

5.1. Material biológico

5.1.1. Sementes

As sementes de *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*, coletadas no Estado do Ceará, foram identificadas no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, selecionadas e devidamente estocadas até uso posterior.

5.1.2. Hemácias

Hemácias de coelho albino foram coletadas de animais adultos provenientes do biotério do LABLEC da Universidade Federal do Ceará.

5.2. Outros materiais

As matrizes cromatográficas Sephadex G-50 e Sepharose 4B-CNBr foram adquiridas da Amersham Pharmacia Biotech Inc. Os açúcares (D(+)-glucose, D(+)-galactose, D(+)-xilose, D(+)-manose, D(+)-arabinose, D(-)-frutose), os marcadores de peso molecular e α -amilase foram adquiridos da Sigma Chemical Co. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

MÉTODOS

6. Métodos

6.1. Identificação botânica das plantas

As plantas e sementes de *Dioclea altíssima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*, coletadas no Estado do Ceará, foram identificadas em comparação com as exsicatas das plantas catalogadas e depositadas no Herbário Prisco Bezerra (EAC) do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará:

Canavalia brasiliensis Mart., Trepadeira de flor púrpura. Coletada no Campus do Pici, Fortaleza, CE. EAC, 18.636.

Cratylia floribunda Benth. Trepadeira. Coletada no Campus do Pici, Fortaleza, CE. EAC, 12.796.

Dioclea altíssima (Vell) Rock, *Dioclea violácea* Mart ex Benth. Trepadeira de flor púrpura. Coletada em Ubajara, CE. EAC, 22.467.

6.2. Preparação das farinhas de sementes

As sementes quiescentes tiveram seus tegumentos retirados manualmente e os cotilédones foram fragmentados e pulverizados em moinho de lâmina, até a obtenção das farinhas.

6.3. Extração das proteínas das farinhas de sementes

As farinhas das sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altíssima* foram submetidas a extrações em NaCl 0,15 M na proporção de 1:20 (m/v), sob agitação ocasional, durante 3 horas. As suspensões foram centrifugadas a 10000 x g por 30 minutos a 4 °C. Os resíduos foram novamente extraídos em NaCl 0,15 M 1:10 (m/v), durante 1 hora, e centrifugados a 10000 x g por 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram então reunidos e as proteínas precipitadas com sulfato de amônio a 90% de saturação. Após centrifugação a 10000 x g por 30 minutos a 4 °C, as proteínas precipitadas foram redissolvidas em água destilada e dialisadas contra NaCl 0,15 M, à temperatura de 10 °C com trocas exaustivas e a fração foi denominada de fração 090.

6.4. Isolamento das lectinas das frações 090 por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50

Após adição de Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM em NaCl 0,15 M, as frações 090 foram centrifugadas a 10000 x g por 30 minutos a 4 °C, e cromatografadas em coluna de afinidade Sephadex G-50 (7,6 cm de altura x 1,8 cm de diâmetro). A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM, e os picos retidos, eluídos com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Os picos retidos foram novamente cromatografados sob as mesmas condições. A eluição da coluna foi realizada sob fluxo constante (0,5 mL/min) e as frações coletadas tiveram as absorbâncias determinadas a 280 nm. As frações ricas em lectinas foram dialisadas contra água destilada, e foram armazenadas em freezer, para posteriores ensaios. A figura 6 mostra os passos seguidos para extração e isolamento das lectinas das três sementes.

6.5. Ensaio de atividade hemaglutinante

Para a determinação da atividade hemaglutinante nos extratos salinos e frações lectínicas, foi utilizado o método descrito por Moreira e Perrone (1977), em placas de microtitulação de fundo V. As placas de microtitulação receberam inicialmente 50 µL de NaCl 0,15 M em cada poço, em seguida 50 µL das amostras foram acrescentados ao primeiro poço de cada fileira e diluídas seriadamente (1:2, 1:4, 1:8,...), posteriormente foi adicionado a estas soluções, igual volume de uma suspensão de hemácias de coelho a 2%, sem tratamento enzimático (diluída em NaCl 0,15 M). As placas foram incubadas em estufa por 30 minutos a 37°C, seguidos por mais 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, foi então procedida a visualização dos aglutinados a olho nu. Os títulos de hemaglutinação (UH) foram calculados como sendo o recíproco da maior diluição ainda capaz de provocar aglutinação das hemácias.

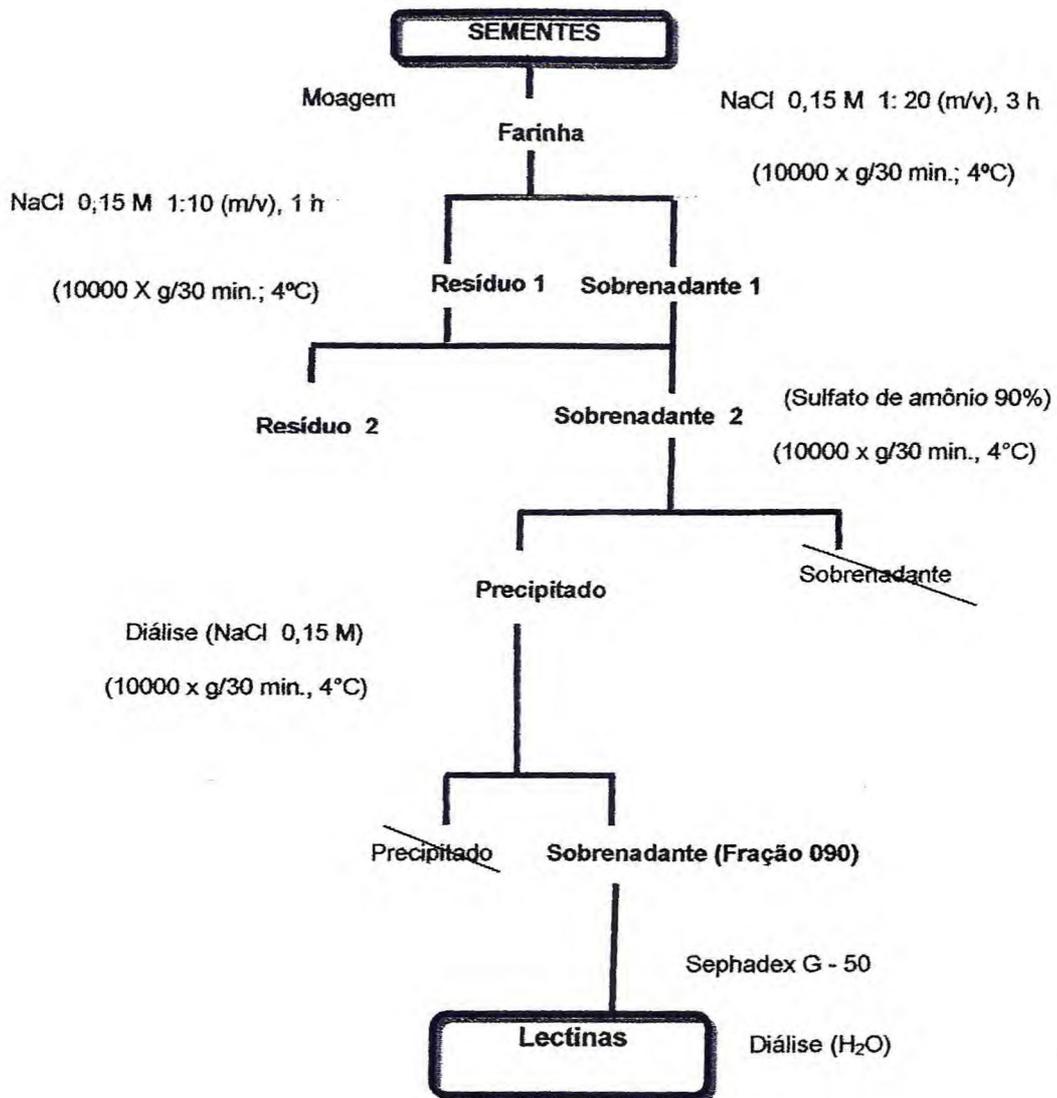


FIGURA 6. Esquema de extração e isolamento das lectinas das sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altíssima*, adaptado de MOREIRA, 1998.

6.6. Obtenção e fracionamento dos polissacarídeos insolúveis das farinhas das sementes

As farinhas das três sementes foram submetidas a extrações de proteínas com NaCl 0,15 M (1:20) (m/v) durante 3 horas sob agitação constante e, após esse tempo, os extratos foram centrifugados a 10000 x g por 30 minutos. Os resíduos (R 1) foram novamente extraídos com NaCl 0,15 M (1:10) (m/v) por 1 hora e centrifugados a 10000 x g por 30 minutos. Os resíduos obtidos (R 2) foram reextraídos com tampão glicina 0,1 M, pH 2,6 (1:10) (m/v) e centrifugados a 10000 x g por 30 minutos. Após a centrifugação, obteve-se o resíduo bruto (R 3).

Inicialmente, para fracionar o resíduo bruto (R 3), foi realizada uma extração em H₂O a 70 °C (1:5) (m/v) por 1 hora de agitação em banho-maria, seguida de centrifugação (10000 x g/30 min). Em seguida, o resíduo foi submetido à extração em NaOH 1 M (1:5) (m/v) durante 1 hora e, após centrifugação (10000 x g/30 min), o resíduo remanescente foi extraído em NaOH 4 M, sob as mesmas condições anteriores. Após serem neutralizados com ácido acético, os sobrenadantes obtidos no fracionamento foram precipitados com álcool etílico (1:2) (v/v) e liofilizados.

A figura 7 representa de forma esquemática, os passos seguidos para a obtenção e fracionamento dos resíduos brutos das três sementes estudadas.

6.7. Reticulação do resíduo bruto (R 3) das sementes com epiclorigrina

Os polissacarídeos oriundos das diferentes sementes foram individualmente reticulados com epiclorigrina segundo Appukutan *et al.*, (1977), onde para cada 1,0 g do resíduo bruto (R 3), foram adicionados 0,3 mL de epiclorigrina e 3,0 mL de NaOH 3 M. As misturas foram agitadas manualmente e mantidas em estufa por 24 horas a 40°C, e em seguida, a temperatura foi elevada a 70°C por mais 12 horas. Após esse período, o material foi lavado exaustivamente com água destilada até que o pH ficasse neutro. O material foi homogeneizado e passado em peneira de aproximadamente 30 mesh, e as partículas finas foram retiradas por levagem exaustiva com água destilada.

Após a última lavagem com água dos polissacarídeos reticulados, as colunas montadas foram lavadas com solvente de equilíbrio (NaCl 0,15 M). A figura 8 esquematiza e exhibe a reação de reticulação dos polissacarídeos.

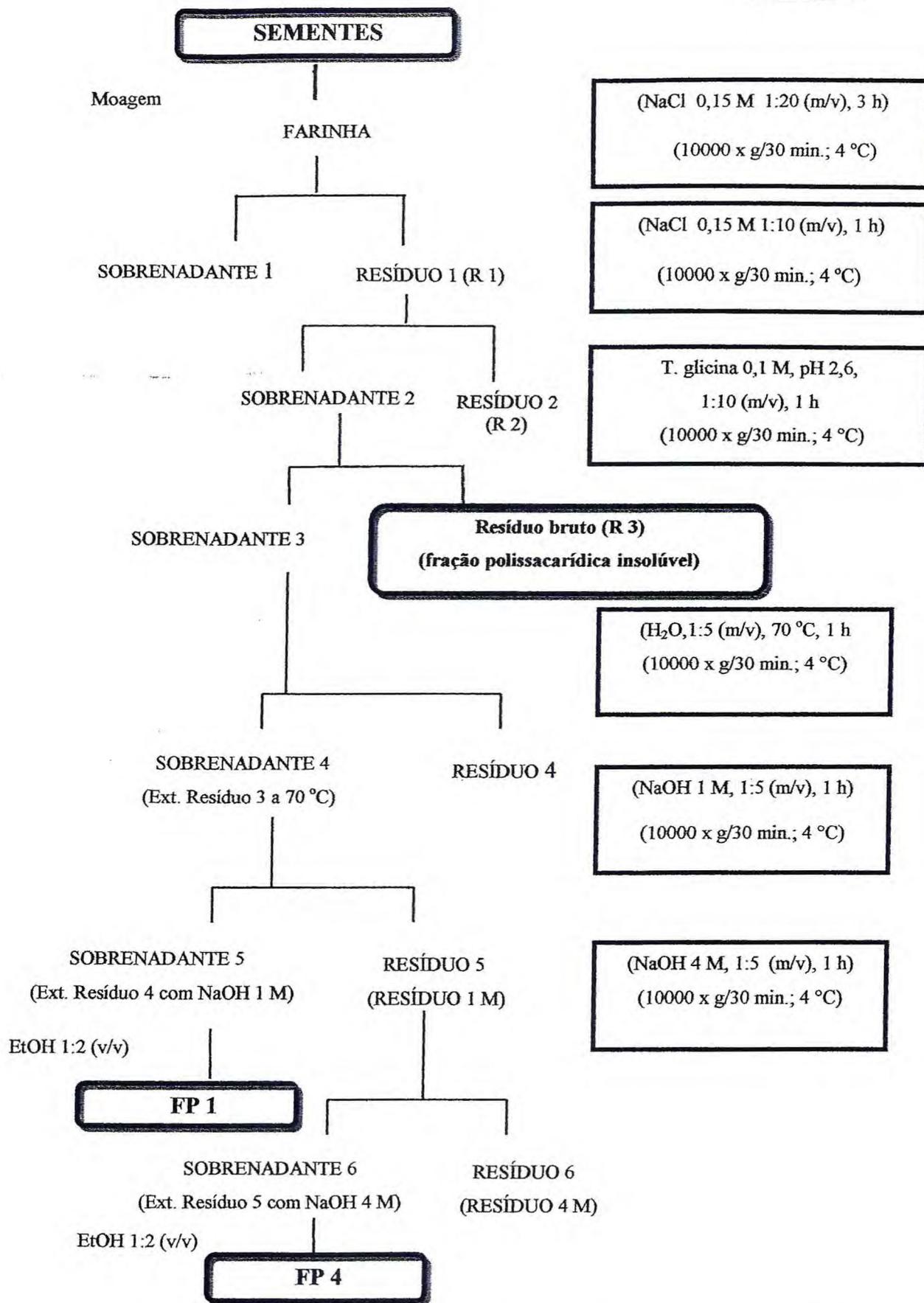
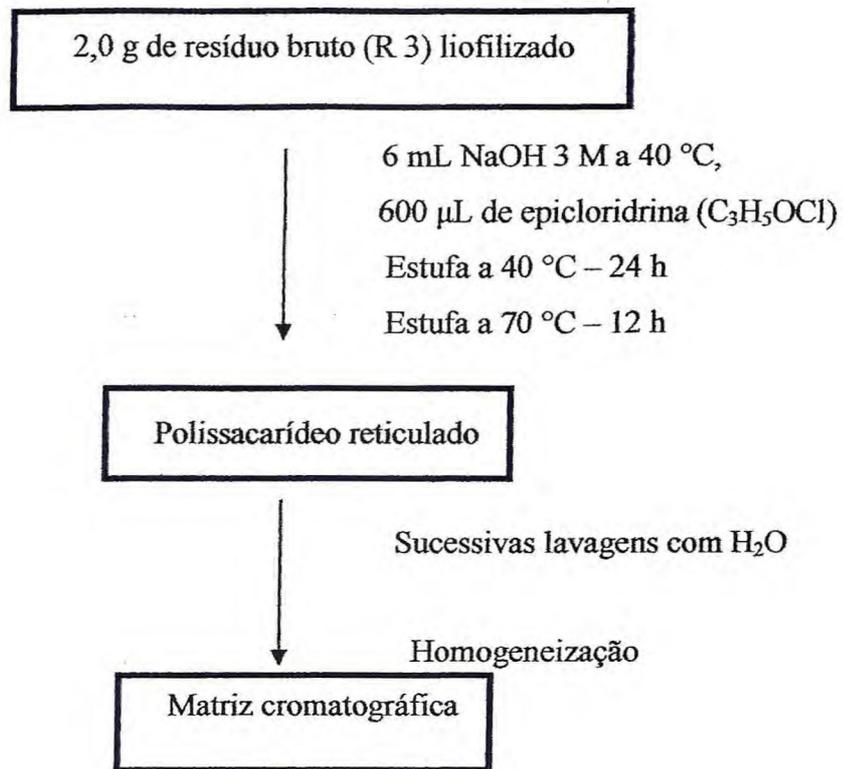


FIGURA 7. Obtenção e fracionamento dos polissacarídeos das farinhas das sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altíssima*.

(A)



(B)

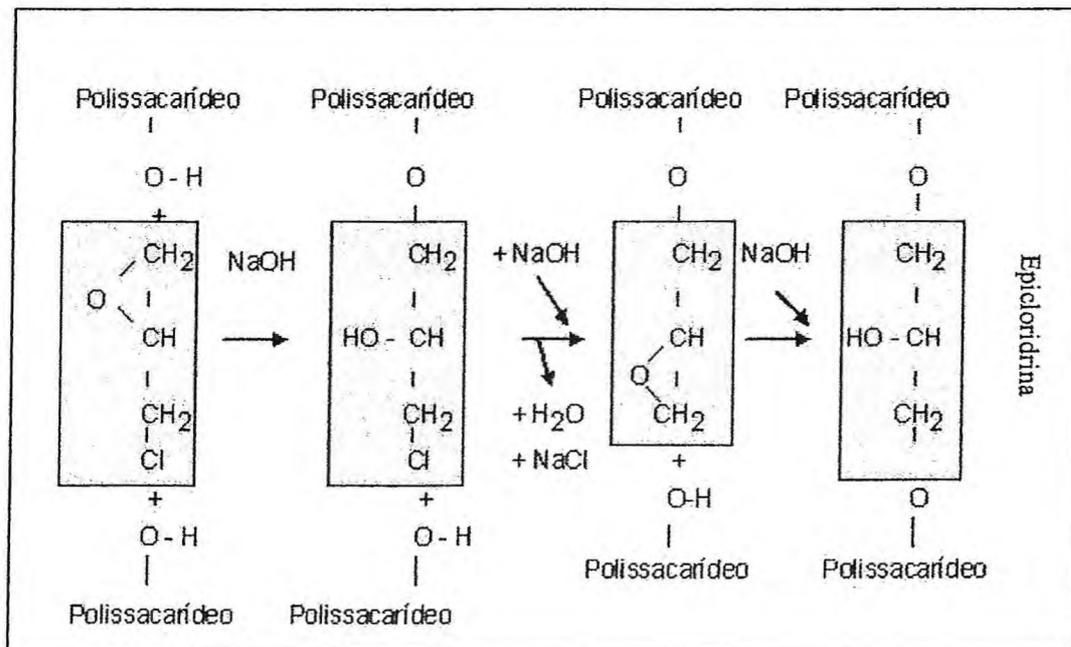


FIGURA 8. Esquema (A) e reação de reticulação (B) dos resíduos brutos (R 3) com epicloridrina.

6.8. Isolamento das lectinas das frações 090 por cromatografia de afinidade em colunas dos resíduos brutos (R 3) reticulados

Foram realizadas cromatografias de afinidade das frações obtidas por precipitação com sulfato de amônio (0-90%) em colunas de resíduos brutos reticulados (R 3) de *Dioclea altissima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda* (4,0 cm de altura x 2,0 cm de diâmetro), para detectar a interação lectina-receptor insolúvel.

As frações 090 de cada uma das sementes foram cromatografadas em todas as colunas dos resíduos brutos reticulados. As colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM, e os picos retidos, eluídos com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. A eluição das colunas foi realizada sob fluxo constante (0,6 mL/min) e as frações coletadas tiveram as absorbâncias determinadas a 280 nm.

Foi realizado um teste de atividade hemaglutinante com hemácias de coelho não tratadas nos picos retidos e não-retidos coletados após serem dialisados contra NaCl 0,15 M.

Através do cálculo da área, pela densidade óptica (D. O.) total dos picos retidos em cada uma das cromatografias e, considerando os coeficientes de extinção de cada lectina, foi possível determinar os valores de retenção lectínica em mg de lectinas/mL de gel.

6.9. Análises das frações polissacarídicas dos resíduos brutos (R 3)

6.9.1. Hidrólises ácidas

As hidrólises ácidas totais das frações polissacarídicas obtidas por extração em NaOH 1 M (FP 1) e NaOH 4 M (FP 4) foram realizadas em tubos, devidamente lacrados, com ácido trifluoracético (TFA) nas seguintes condições:

Alíquotas de 10mg das frações foram dissolvidas em 1mL de água destilada e mantidas sob agitação por uma noite em tubos para hidrólise. Após adição de 1mL de TFA 2 M, foram mantidas em estufa a 100 °C por 5 horas. Após hidrólise e evaporação do TFA à temperatura ambiente, as frações glicídicas foram solubilizadas em 500 µL de água,

centrifugadas a 6000 x g por 5 minutos e aplicadas nos *spots* para a cromatografia em camada delgada.

6.9.2. Identificação das frações polissacarídicas insolúveis por cromatografia em camada delgada

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em placas de vidro (16,5 x 15 cm) onde foi aplicada uma mistura de sílica gel em água 12 g/32 mL (m/v). As placas foram previamente impregnadas com ácido bórico a 0,034 M e ativadas em estufa a 100 °C por 1 hora.

As frações FP 1 e FP 4 foram aplicadas com micropipetas e secas nas placas com o auxílio de secador. Foram realizadas duas corridas. A primeira, com fase móvel constituída de N-butanol, álcool etílico e água (4:1:1) durante 3 horas; a segunda fase móvel constituída de N-butanol, ácido acético e água (4:1:1) por 3 horas. A cromatografia foi revelada borrifando a solução reveladora: (12,163 mL de metanol, 0,3375 mL de ácido sulfúrico e 0,0625 g de orcinol) a 100 °C por 20 minutos.

Foram utilizados como padrões, os monossacarídeos glucose, manose, xylose, arabinose, e galactose.

Os fatores de retenção (Rf) foram calculados conforme o seguinte cálculo: $R_f = \frac{d}{D}$, onde d é a distância percorrida pela amostra em cm e D é a distância total percorrida pelo solvente.

6.9.3. Hidrólise enzimática do amido

As frações FP 1 e FP 4 foram submetidas à hidrólise enzimática do amido com α -amilase de *type VIII-A* (Sigma). Inicialmente, para um ensaio analítico, preparou-se o tampão da enzima: tampão acetato 0,025 M com CaCl_2 2,5 mM em NaCl 0,15 M pH 6,5. É uma solução enzimática concentrada contendo 200 mg de enzima/mL de tampão de enzima.

Uma suspensão (50 mg/mL) de polissacarídeo em tampão da enzima foi homogeneizada com o auxílio de um *poter* e transferida para um tubo de ensaio. Aliquotas de 1mL foram incubadas com a enzima em concentrações crescentes de 20 mg/mL a 200 mg/mL, completando-se o volume final para 2 mL com o tampão da enzima, com

concentração final de 25 mg de polissacarídeo/mL a 70 °C. A cada 10 minutos, foram aliqüotados 10 µL da solução e acrescentada uma gota de lugol, indicador da presença de amido. Após hidrólise do amido e teste negativo com lugol, os polissacarídeos foram precipitados com álcool etílico 1:2 (m/v), centrifugados e liofilizados para posterior caracterização.

6.9.4. Retenção das lectinas em colunas das frações FP 1 e FP 4

As frações FP 1 e FP 4 de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima* obtidas a partir do fracionamento dos resíduos brutos e tratadas com α -amilase, foram lavadas exaustivamente com NaCl 0,15 M até extrair toda a amilase presente no meio.

Após liofilização, 11,7 mg das frações foram deixados em contato em tubos *ependorffs* com 1,5 mL das lectinas purificadas (1mg/mL) em NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM por 30 min. Após esse tempo, o material foi submetido a lavagens sucessivas com NaCl 0,15 M e centrifugado em microcentrífuga (12000 x g) durante 5 minutos, até zerar os valores de densidade óptica a 280 nm. As lectinas retidas foram eluídas com tampão glicina 0,1 M, pH 2,6, contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Os valores de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro a 280 nm. O teor de lectinas retidas (por 1 mg de polissacarídeo tratado) pode ser calculado, considerando os coeficientes de extinção de cada lectina.

6.9.5. Hidrólise ácida total das frações FP 1 e FP 4, tratadas com α -amilase

As frações FP 1 e FP 4, após tratamento com α -amilase, foram submetidas a hidrólise ácida total em tubos hermeticamente fechados, utilizando ácido trifluoracético (TFA) de acordo com o seguinte procedimento:

A 1 mL das frações polissacarídicas solubilizadas em água na concentração de 10 mg/mL foi adicionado 1 mL de TFA 2 M. As amostras foram, então, aquecidas durante 5 horas em banho fervente. Após esse tempo, o excesso do ácido foi removido por evaporação a vácuo, e realizadas sucessivas lavagens com água.

6.9.6. Redução e acetilação dos polissacarídeos

Após a hidrólise ácida total dos polissacarídeos, os monossacarídeos resultantes foram reduzidos e acetilados para análise em cromatografia líquido-gasosa (G.L.C.). Os monossacarídeos reduzidos com boridreto de sódio (NaBH_4), à temperatura ambiente, durante 24 horas, foram em seguida tratados com resina LEWATIT S-100 (forma H^+) para remover os íons Na^+ . Após a filtração, as soluções foram concentradas em evaporador rotatório a vácuo, com temperatura de no máximo $50\text{ }^\circ\text{C}$, até a secura. Lavagens sucessivas com 2 mL de metanol (3 vezes) foram realizadas a fim de eliminar o ácido bórico formado. Durante a co-destilação com o metanol, o ácido bórico é eliminado na forma de éster volátil de borato de trimetila.

Os alditóis resultantes foram então acetilados à temperatura ambiente, com uma mistura de anidrido acético: piridina 1:1 (v/v), durante 16 horas. O processo de esterificação foi interrompido pela adição de gelo moído e os produtos acetilados extraídos com 2 mL de clorofórmio. A piridina residual na fase clorofórmica era removida por sucessivas lavagens com solução de sulfato de cobre (CuSO_4) 5% e água destilada. Após a evaporação do solvente, os acetatos de alditóis foram analisados por cromatografia líquido-gasosa.

6.9.7. Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa (G.L.C.-MS)

As análises de cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo VARIAN 3300 acoplado a um espectrômetro de massa FINNIGAN MAT munido com ITS-40, e utilizando coluna capilar db-210, tendo como gás de arraste hélio ultrapuro com fluxo de 2 mL/min, com temperatura variando entre 50 e $220\text{ }^\circ\text{C}$.

6.10. Identificação e caracterização dos receptores solúveis

6.10.1. Imobilização das lectinas purificadas em coluna de Sepharose- 4B ativada

Para a imobilização das lectinas previamente purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50, o gel de Sepharose 4B-CNBr foi preparado a partir de 3 g de Sepharose 4B- CNBr e suspenso em HCl 1 mM. Em seguida, o gel foi lavado com HCl 1 mM em 5 porções de 120 mL, num total de 600 mL (200 mL/g de Sepharose 4B- CNBr).

Foi adicionado um volume igual de NaHCO₃ 0,2 M pH 8,3 em NaCl 1 M a um volume de 7 mL de uma solução concentrada de lectina em D-Glucose 0,4 M.

Ao gel filtrado, acrescentou-se a solução de lectina, mantendo por agitação durante 2 horas à temperatura ambiente. Após centrifugação a 10000 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado. Para avaliar a reação, fez-se a leitura de densidade óptica com tampão NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 + D-Glucose 0,4 M. O precipitado foi lavado com 5 porções de 100 mL de NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 em NaCl 0,5 M. O gel foi mantido em tampão Tris-HCl pH 8,0 em NaCl 0,5 M por 2 horas, sob refrigeração para bloquear os grupos ativos remanescentes da matriz cromatográfica.

O gel filtrado foi montado em coluna (6,0 cm de altura x 1,0 cm de diâmetro) e lavado alternadamente por 3 ciclos com soluções de tampão acetato 0,1 M pH 4,0 em NaCl 0,5 M, tampão Tris-HCl pH 8,0 em NaCl 0,5 M, e com NaCl 0,15 M.

6.10.2. Extração e isolamento dos receptores solúveis

As farinhas das sementes foram submetidas a extração em NaCl 0,15 M (1:10) (m/v) por 3 horas sob agitação constante e centrifugados a 10000 x g por 30 minutos. Os sobrenadantes (extratos brutos) foram aplicados em coluna Sepharose - 4B ativada com as lectinas imobilizadas.

As colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M com Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺ 5 mM e os picos retidos foram eluídos com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 com Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺ 5 mM. A eluição das colunas foi realizada sob fluxo constante (0,3 mL/min), e as frações coletadas tiveram as absorvâncias determinadas a 280 nm.

6.10.3. Cromatografia seqüenciada dos receptores solúveis em colunas de afinidade

Os picos retidos eluídos das cromatografias em coluna de Sepharose-lectinas (P 2) foram neutralizados com tampão Tris-HCl 2 M pH 8,0 e cromatografados em sistema seqüenciado Sephadex G-50 (6,0 cm de altura x 1,0 cm de diâmetro) e Sepharose-lectinas (6,0 cm de altura x 1,0 cm de diâmetro).

Após a eluição do material não retido (SL 1) com solução de NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM, as colunas foram eluídas separadamente com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Foi eluído um pico retido da coluna de Sephadex G-50 e eluídos um pico não-retido (SL 1) e um pico retido (SL 2) da coluna de Sepharose-lectinas. A eluição foi realizada com fluxo constante (0,3 mL/min), e as frações coletadas tiveram as absorbâncias determinadas em espectrofotômetro a 280 nm. A figura 9 esquematiza a extração e isolamento dos receptores solúveis.

6.10.4. Determinação quantitativa dos carboidratos dos receptores solúveis

Os picos retidos (P 2) das cromatografias dos extratos salinos em colunas de Sepharose 4B-lectinas foram submetidos à determinação quantitativa de carboidratos pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), utilizando galactose como padrão. As alíquotas de 250 μL das frações coletadas foram diluídas com 250 μL de água destilada (1:2) (v/v) e foram adicionados 500 μL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico. Após agitação, a mistura foi deixada em repouso por 15 minutos. As leituras de absorbância foram realizadas a 490 nm, e a concentração de carboidrato foi estimada com relação a uma curva padrão de galactose, variando de 10 a 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de concentração.

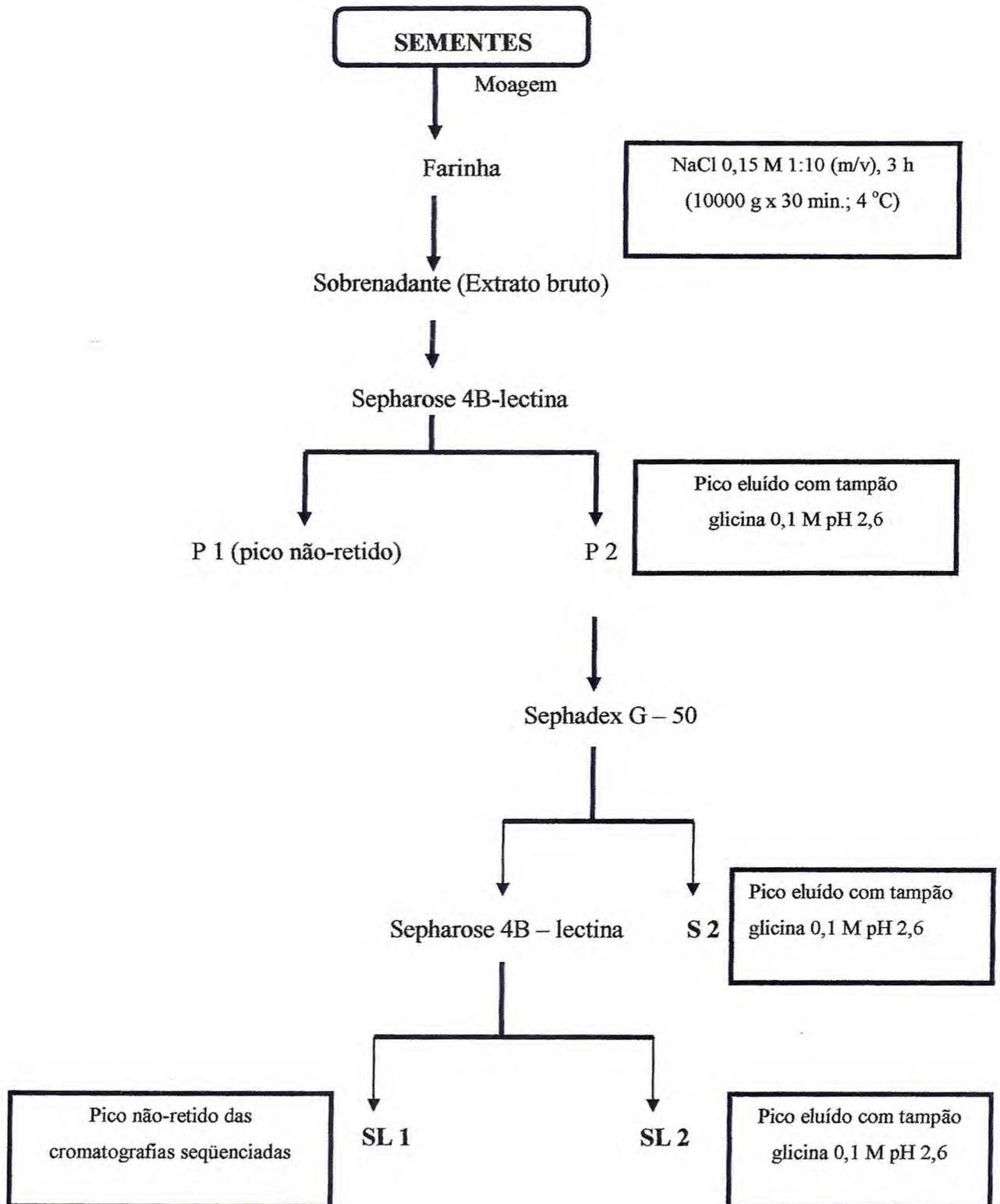


FIGURA 9. Extração e isolamento dos receptores solúveis das sementes de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*.

6.10.5. Determinação do poder inibitório dos receptores solúveis sobre a atividade hemaglutinante das lectinas

Os ensaios de inibição das atividades hemaglutinantes das lectinas foram realizados em placas de microtitulação, em triplicata. Foram aplicados em cada poço, no sentido de A para H, 50 µL de solução de NaCl 0,15 M contendo CaCl_2^{++} 5 mM e MnCl_2^{++} 5 mM e, então, realizadas diluições seriadas a partir de 50 µL da solução do receptor solúvel (0,38 mg/mL). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, partindo-se de 50 µL de lectinas (no sentido de 1 para 12) de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea altíssima* e *Cratylia floribunda*, (0,4 mg/ml).

Foram realizados ensaios com as lectinas e seus respectivos receptores, como também foram realizadas permutas: testou-se a capacidade inibitória dos receptores de cada espécie de semente aqui estudada com relação às lectinas das três sementes.

Após 30 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 50 µL de suspensão de hemácias a 2%, em cada poço. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C durante 30 minutos e, em seguida, à temperatura ambiente por mais 30 minutos. Os títulos de hemaglutinação foram determinados, observando-se a maior diluição que ainda apresentou hemaglutinação total.

6.10.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As lectinas isoladas por cromatografia de afinidade em colunas dos resíduos brutos reticulados e os pares lectinas-receptores isolados por cromatografias seqüenciadas em colunas de afinidade de Sephadex G-50 e Sepharose-lectinas foram analisadas conforme ensaios eletroforéticos.

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e β-mercaptoetanol foram realizados conforme a técnica de Laemmli (1970). As frações correspondentes aos receptores solúveis foram também analisadas sem β-mercaptoetanol.

As placas utilizadas tinham dimensões de 18 x 16,7 cm. Foi utilizado um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e um gel de separação contendo 12,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8. A espessura do gel de poliacrilamida era de 1 mm. A corrida foi desenvolvida a temperatura ambiente,

com a amperagem inicial fixada em 40 mA e voltagem inicial de 210 Volts. As corridas tiveram duração média de quatro horas.

Após o término da corrida, as bandas protéicas das lectinas isoladas por cromatografia de afinidade em colunas dos resíduos brutos (R 3) reticulados de *Dioclea altissima* foram coradas conforme a técnica abaixo:

Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05% em água, ácido acético e metanol (60:10,5:79,5; v/v/v) durante 1 hora, sendo o gel descorado em seguida com solução descorante de água; ácido acético; metanol (8:1:3,5; v/v/v).

Foi utilizado o reagente de Schiff para visualização de glicoproteínas. Conforme esta técnica, o gel é fixado em ácido acético 7,5% durante 60 minutos à temperatura ambiente, em seguida é transferido para uma solução de ácido periódico 0,2%, durante 45 minutos a 4 °C. Em seguida, o gel é transferido para o reagente de Schiff, onde é mantido por aproximadamente 45 minutos entre 4 a 8 °C. O descoramento é realizado com ácido acético 10%.

Os demais experimentos de eletroforese, após o término de cada corrida, foram revelados com o reagente de prata segundo o método de Blum, Bier e Gross (1987). O gel foi fixado com metanol 50% com ácido acético 12% e formaldeído 37% durante 60 minutos. Após esse tempo, foi removida a solução de fixação com 3 lavagens de 20 minutos com etanol 50%. O pré-tratamento do gel foi realizado com tiosulfato de sódio (0,2 g/L) por 1 minuto e removida a solução com água destilada. O gel foi impregnado com nitrato de prata (0,2 g/100 mL) contendo 75 µL de formaldeído por 20 minutos. Lavado com água destilada e revelado com carbonato de sódio (60 g/L) contendo 50 µL de formaldeído e 2,0 mL da solução de tiosulfato.

O gel foi lavado com água destilada e a revelação foi interrompida com metanol 50% contendo ácido acético 12%. Posteriormente, o gel foi lavado com metanol 50% até a secagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

7. Resultados e discussão

7.1. Isolamento das lectinas por cromatografias de afinidade em coluna de Sephadex G-50

As frações 090 de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* foram aplicadas à coluna de Sephadex G-50, e a eluição das frações retidas e não-retidas à coluna foi realizada sob fluxo constante (0,5 mL/min), com suas absorvâncias determinadas a 280 nm.

As amostras aplicadas às colunas (frações ricas em lectinas) foram suficientes para saturar a coluna de Sephadex G-50; saturação esta determinada pela detecção de atividade hemaglutinante nos picos não-retidos.

Com o abaixamento do pH através da adição do tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM, as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e de *Dioclea altíssima* foram liberadas da malha de poldextrana e então eluídas da coluna de Sephadex G-50. O isolamento das lectinas através desta poldextrana comercial foi realizado como experimento de referência para as cromatografias subseqüentes com as matrizes confeccionadas a partir da reticulação dos polissacarídeos extraídos das farinhas das sementes. As lectinas isoladas nessa etapa foram imobilizadas em colunas de Sepharose-4B para isolamento dos receptores solúveis.

A figura 10 representa os perfis cromatográficos dos extratos salinos típicos de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* em colunas de Sephadex G-50.

Foram realizados testes de atividade hemaglutinante com hemácias de coelho não tratadas nos picos não-retidos, e retidos coletados após serem dialisados contra NaCl 0,15 M. Os picos protéicos retidos, apresentando valores padronizados de densidade óptica iguais a 1,0, hemaglutinaram hemácias de coelho a 2% e os títulos de atividade hemaglutinante obtidos foram de 1024 UH/mL, para as lectinas de *Dioclea altíssima*, *Canavalia brasiliensis* e de 128 UH/mL para a lectina de *Cratylia floribunda*.

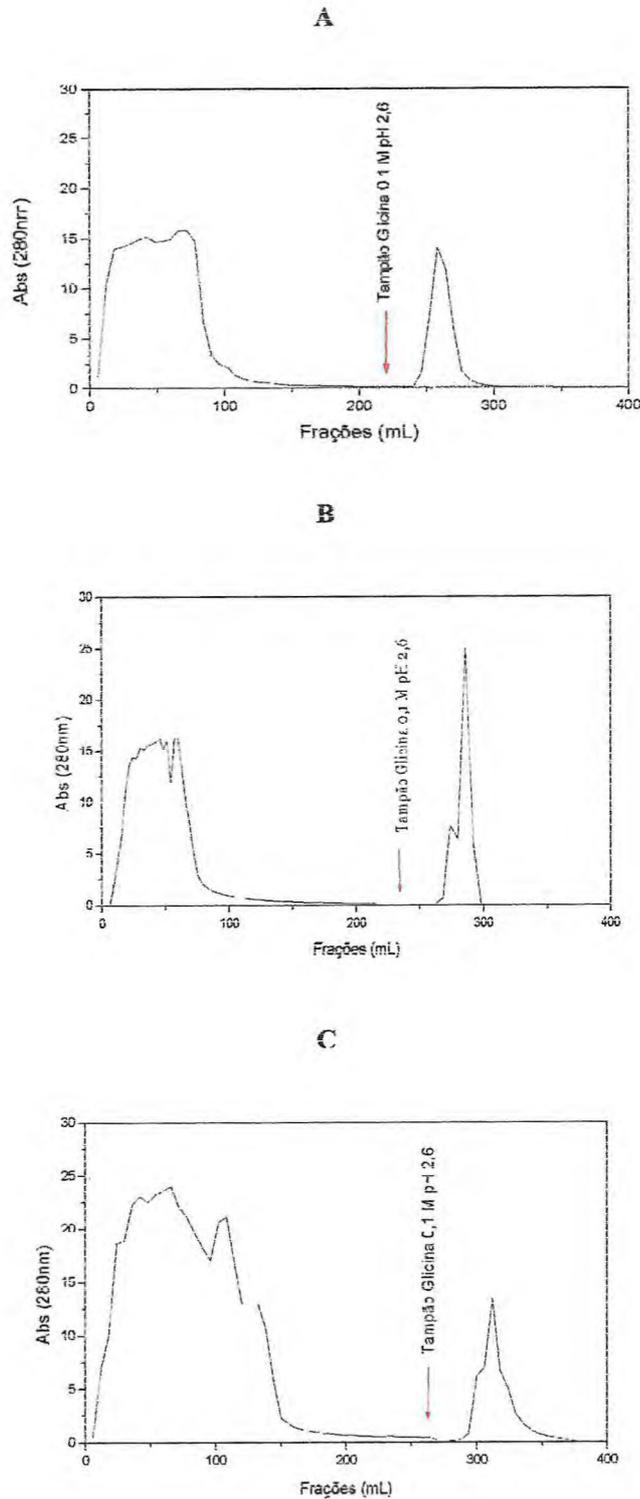


FIGURA 10. Cromatografias de afinidade das frações 090 de (A) *Dioclea altissima*, (B) *Cratylia floribunda* e (C) *Canavalia brasiliensis* em coluna de Sephadex G-50. A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. O pico retido foi eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Vol da coluna: 34mL. Frações de 3,0 mL foram coletadas sob fluxo contínuo de 0,5 mL/min.

7.2. Isolamento das lectinas por cromatografias de afinidade em colunas dos resíduos brutos (R 3) reticulados

Foram também realizadas cromatografias de afinidade das frações 090 em colunas dos resíduos brutos (R 3) reticulados com epicloridrina na presença de NaOH 3 M. Foram aplicadas as mesmas quantidades de proteínas em todas as colunas testadas.

A figura 11 representa os perfis cromatográficos típicos dos extratos salinos de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* em colunas dos resíduos brutos reticulados.

As lectinas de *Dioclea altíssima* e *Canavalia brasiliensis*, com valores padronizados de densidade óptica iguais a 1,0, apresentaram atividades hemaglutinantes frente a hemácias de coelho a 2%, com títulos de 1024 UH/mL, enquanto que a lectina de *Cratylia floribunda* apresentou título de 128 UH/mL. Também foram detectadas atividades hemaglutinantes em todos os picos não-retidos.

As figuras 12, 13 e 14 representam os perfis eletroforéticos típicos em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5% das lectinas isoladas por cromatografia de afinidade em colunas dos resíduos reticulados de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*.

Conforme os dados citados anteriormente, as lectinas foram isoladas a partir dos polissacarídeos insolúveis presentes nas sementes. Outros autores já haviam observado que polissacarídeos de outras sementes de leguminosas eram capazes de reter lectinas (HORTA-BARROS, 1987; TAVARES, 1998, 2002; TEIXEIRA, 2005).

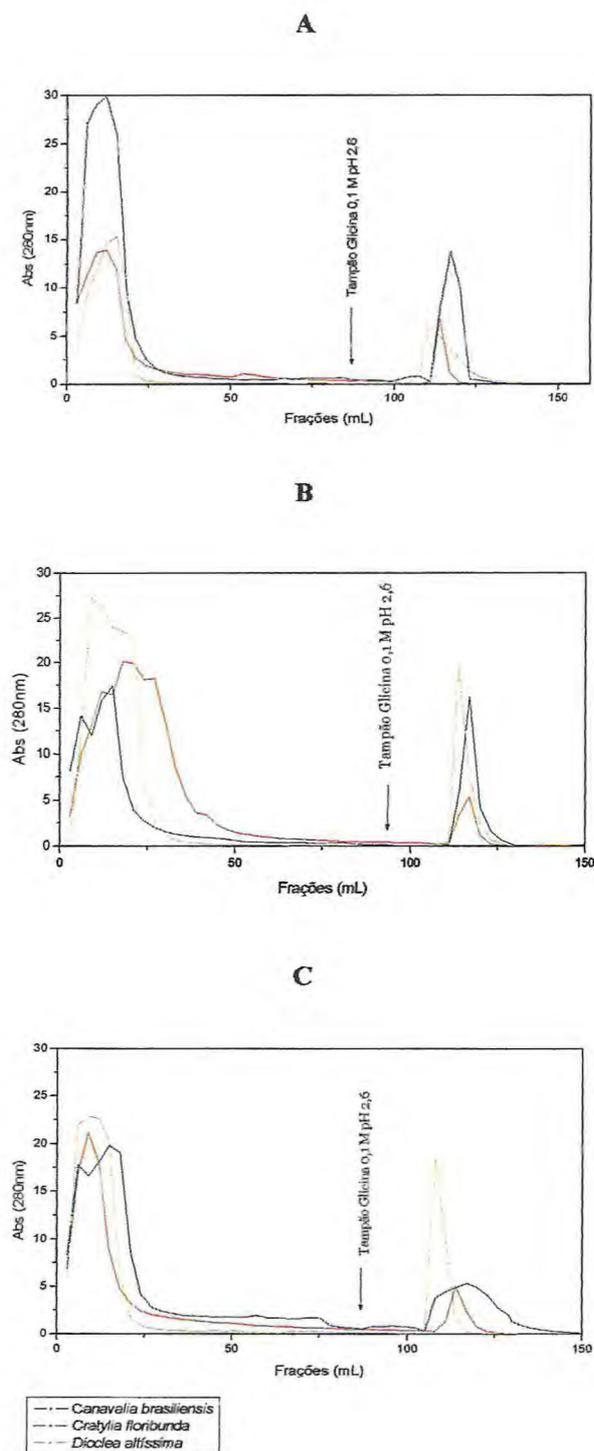


FIGURA 11. Cromatografias de afinidade das frações 090 em coluna dos resíduos brutos (R 3) reticulados de (A) *Dioclea altissima*, (B) *Cratylia floribunda* e (C) *Canavalia brasiliensis*. A coluna foi equilibrada contendo NaCl 0,15 M com Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Os picos retidos foram eluídos com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Volume da coluna: 12 mL. Fluxo: 0,6 mL/min.

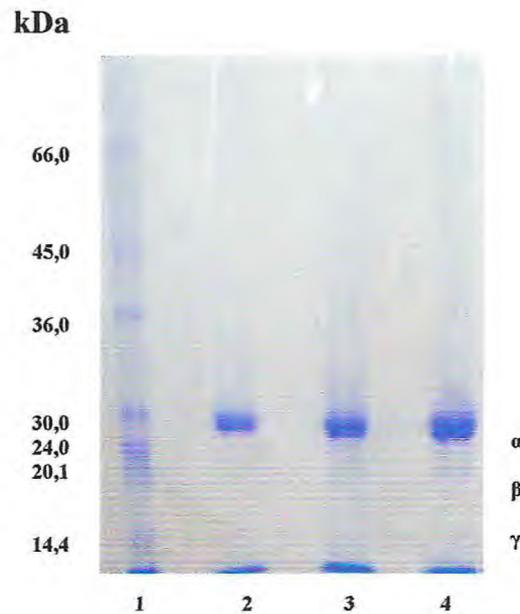


FIGURA 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β-mercaptoetanol das lectinas de (2) *Dioclea altissima*, (3) *Cratylia floribunda* e (4) *Canavalia brasiliensis* isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de resíduo bruto (R 3) reticulado de *Dioclea altissima*. (1) Marcadores de massa molecular BSA (66,0 kDa); Ovoalbumina (45,0 kDa); Gliceraldeído-3-P desidrogenase (36,0 kDa); Anidrase carbônica (30,0 kDa); Tripsinogênio (24,0 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa); α-lactoalbumina (14,4 kDa). α – Cadeia α; β – Cadeia β; γ – Cadeia γ.

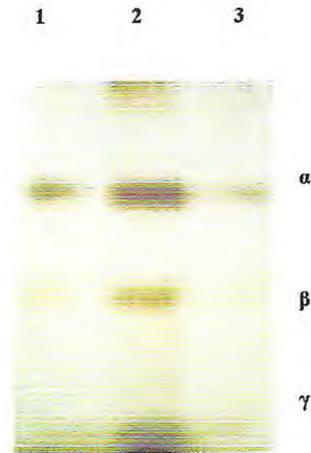


FIGURA 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol das lectinas de *Cratylia floribunda*, *Dioclea altíssima* e *Canavalia brasiliensis* isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de resíduo bruto (R 3) reticulado de *Canavalia brasiliensis*. α – Cadeia α ; β – Cadeia β ; γ – Cadeia γ .



FIGURA 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol das lectinas de *Cratylia floribunda*, *Dioclea altíssima* e *Canavalia brasiliensis* isoladas por cromatografia de afinidade em coluna de resíduo bruto reticulado (R 3) de *Cratylia floribunda*. α – Cadeia α ; β – Cadeia β ; γ – Cadeia γ .

Objetivando avaliar o teor de retenção das lectinas pelos resíduos brutos, as colunas foram saturadas. De acordo com os valores de densidade óptica a 280 nm, das áreas correspondentes aos Picos II de cada uma das cromatografias, e considerando o coeficiente de extinção (A 1 cm, 1%) em pH 7,2 de 10,47 para a lectina de *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA; CAVADA, 1984), 11,36 para a lectina de *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991), e de 12,0 para a lectina de *Dioclea altissima* em pH 8,3 (MOREIRA, *et al.*, 1997) foi possível determinar os valores de retenção lectínica por cada matriz cromatográfica.

Conforme os dados expressos na tabela 1, 1,15 mg, 0,696 mg e 0,935 mg de lectina de *Canavalia brasiliensis* ficaram retidos por 1,0 mL de gel de *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*, respectivamente. Quando comparada com as demais lectinas, essa lectina apresentou maior teor de retenção pelos três resíduos (R 3).

A lectina de *Dioclea altissima* apresentou maior teor de retenção pelos polissacarídeos de *Cratylia floribunda* (0,610 mg) e *Canavalia brasiliensis* (0,584 mg) do que no próprio resíduo da sua semente (0,352 mg).

A lectina de *Cratylia floribunda*, em comparação com as demais lectinas, apresentou os menores teores de retenção pelos resíduos das três sementes, entretanto, percebe-se segundo a mesma tabela, teores de retenção similares para esta lectina pelos polissacarídios das três sementes.

A partir da análise dos resultados demonstrados pelos perfis cromatográficos na figura 11 e pelos dados da tabela 1, as lectinas estudadas, quando comparadas entre si, apresentaram diferentes intensidades de interação com as matrizes cromatográficas, o que nos leva a sugerir que a interação lectina-polissacarídeos possa depender de pelo menos três fatores:

- (I) Especificidade fina da lectina;
- (II) Estereoespecificidade do sítio de ligação à lectina (parte integrante da coluna cromatográfica);
- (III) Quantidade de receptores insolúveis disponíveis nas frações R 3 de cada semente.

Deve-se considerar, portanto, que a ação conjunta dessas variáveis resulta na capacidade das colunas de afinidade em reter lectinas.

TABELA 1. Retenção lectínica pelas colunas dos resíduos brutos (R 3) reticulados de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*.

Extrato salino	Concentração de lectina retida		
	Resíduo de <i>D. altíssima</i>	Resíduo de <i>C. floribunda</i>	Resíduo de <i>C. brasiliensis</i>
<i>C. floribunda</i>	0,195	0,225	0,217
<i>C. brasiliensis</i>	1,15	0,696	0,935
<i>D. altíssima</i>	0,352	0,610	0,584

7.3. Fracionamento dos resíduos brutos (R 3) das farinhas das sementes

Uma primeira tentativa de fracionamento dos resíduos brutos das farinhas foi realizada através de extrações em água a 70 °C sob banho-maria, durante 1 hora. Entretanto, após centrifugação, não foi possível separar os sobrenadantes dos precipitados, de forma que foi necessária uma nova extração em meio alcalino (NaOH 1 M), sob banho-maria.

Para maximizar a obtenção dos polissacarídeos, os resíduos obtidos foram extraídos exaustivamente com NaOH 4 M, sendo os sobrenadantes neutralizados para então os polissacarídeos serem precipitados e liofilizados.

Após teste positivo de amido com lugol, as frações FP 1 e FP 4 foram submetidas à hidrólise enzimática do amido. Conforme os resultados iniciais do ensaio analítico, foi possível estabelecer as condições ideais de hidrólise total do amido contido nas frações FP 1 e FP 4. A relação obtida foi de 3 g de enzima para hidrolisar 1g de amido em FP 1 a 37 °C, durante 8 horas, e de 2 g de enzima para cada grama de amido em FP 4 a 37 °C, durante 5 horas. Os polissacarídeos obtidos foram lavados exaustivamente com solução de NaCl 0,15 M para retirada da amilase presente no meio.

7.4. Retenção das lectinas em colunas das frações FP 1 e FP 4

Após a hidrólise do amido, foram realizadas cromatografias de afinidade das lectinas nas frações FP 1 e FP 4 de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima*.

Para verificar o teor de retenção das lectinas, as concentrações destas foram obtidas por espectrofotometria a 280 nm, sendo utilizado o coeficiente de extinção (A 1 cm, 1%) em pH 7,2 de 10,47 para a lectina de *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA; CAVADA, 1984), 11,36 para a lectina de *Cratylia floribunda* (OLIVEIRA *et al.*, 1991), e de 12,0 para a lectina de *Dioclea altissima* em pH 8,3 (MOREIRA, *et al.*, 1997). Foi calculada a concentração de lectina retida por mg de polissacarídeo.

Conforme a figura 15, houve maior retenção das três lectinas pelos polissacarídeos das frações FP 1, quando comparados com os polissacarídeos das frações FP 4.

A fração FP 1 de *Canavalia brasiliensis* reteve maior concentração da lectina de *Canavalia brasiliensis* (7,0 µg/mg) quando comparada com as frações FP 1 de *Dioclea*

altíssima e FP 1 de *Cratylia floribunda* (4,5 µg/mg). Conforme os resultados exibidos, não houve diferença significativa quanto aos teores de retenção das frações polissacarídicas FP 4.

Os dados mostrados na figura 15 reforçam os resultados exibidos na tabela 1, em que diferentes intensidades de interação lectina-polissacarídeos são evidenciadas, com a lectina de *Canavalia brasiliensis* apresentando maior teor de retenção pelos três polissacarídeos.

As atividades hemaglutinantes das lectinas também foram detectadas e os títulos observados foram de 64 UH/mL, 128 UH/mL e 128 UH/mL para as lectinas de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*, respectivamente, para valores de densidade óptica de 0,15.

Estes ensaios de cromatografia de afinidade das lectinas purificadas em matrizes dos polissacarídeos insolúveis não-reticulados corroboram a interação *in vitro* das lectinas de gêneros distintos com seus respectivos polissacarídeos.

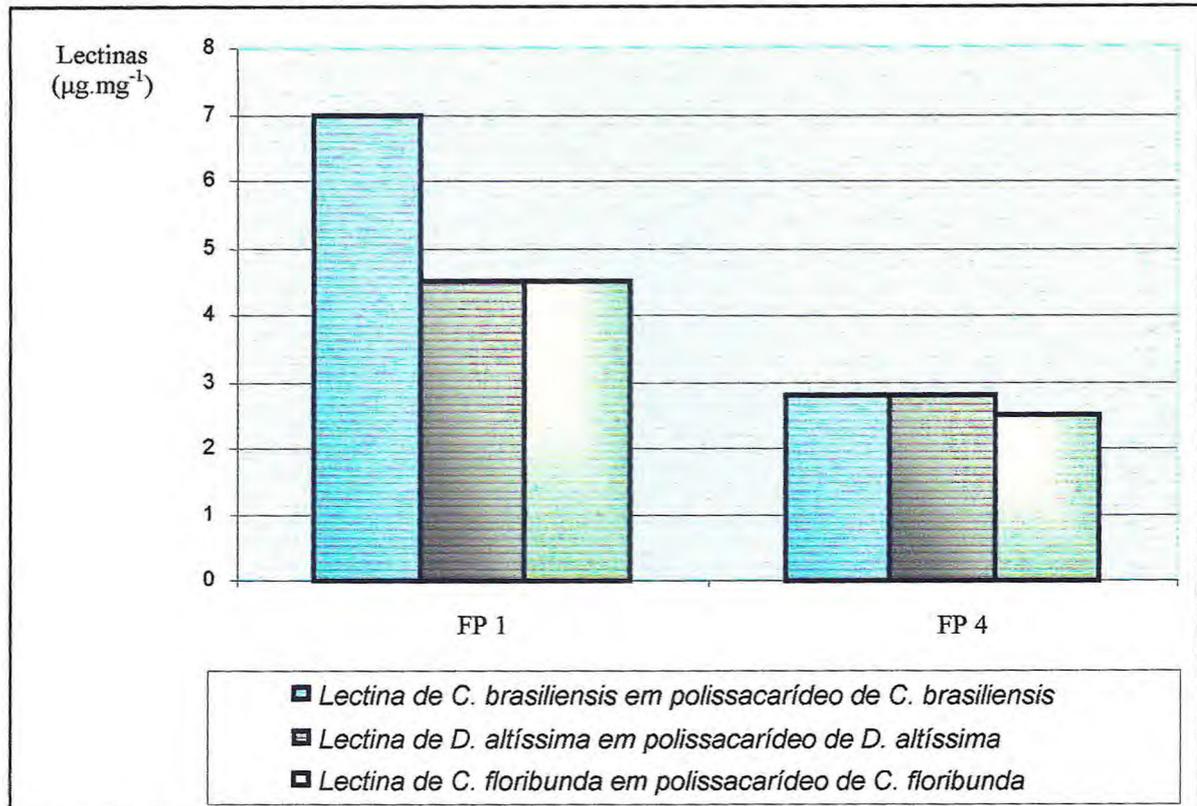


FIGURA 15. Retenção das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea altissima* e *Cratylia floribunda* em colunas de afinidade dos polissacarídeos insolúveis das frações FP 1 e FP 4. As colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M contendo Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺ 5 mM. Os picos retidos foram eluídos com tampão glicina 0,1 M, pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca⁺⁺ e Mn⁺⁺ 5 mM.

7.5. Análise da composição monossacarídica dos polissacarídeos insolúveis por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquido-gasosa

Após as hidrólises ácidas totais das frações polissacarídicas insolúveis com ácido trifluoracético, as frações glicídicas FP 1 e FP 4 foram aplicadas nos *spots* para a cromatografia em camada delgada. Como padrões, os monossacarídeos utilizados na sequência foram: galactose, arabinose, manose, xilose e glucose.

De acordo com os fatores de retenção (Rfs) obtidos dos monossacarídeos padrões, as frações monossacarídicas das frações FP 1 e FP 4 corresponderam aos Rfs do monossacarídeo padrão glucose (0,53) e (0,60), respectivamente, sugerindo a ocorrência deste monossacarídeo em todas as amostras analisadas. Conforme a figura 16 percebe-se também que as frações FP 4 foram hidrolisadas mais eficientemente que as frações FP 1.

Os monossacarídeos obtidos após hidrólise enzimática e ácida dos polissacarídeos insolúveis foram reduzidos e acetilados para análise em cromatografia líquido-gasosa, para análise mais precisa de suas composições monossacarídicas.

Conforme os resultados expressos na tabela 2, as composições monossacarídicas das frações FP 1 e FP 4 de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* apresentaram maiores concentrações do monossacarídeo glucose em relação aos demais monossacarídeos detectados, corroborando os resultados em cromatografia em camada delgada. Em todas as frações FP 1, os percentuais de glucose foram superiores aos encontrados nas frações FP 4, indicativos da presença de glucanos. Entretanto, é possível que a concentração maior do monossacarídeo glucose nas amostras corresponda ainda aos produtos da hidrólise enzimática do amido. Os monossacarídeos galactose, manose, xilose, arabinose e traços de fucose e ramnose estavam presentes em todas as frações analisadas. Os percentuais de galactose, arabinose, xilose e manose foram maiores em todas as frações FP 4, quando comparados com as frações FP 1. Dentre estes, as maiores concentrações observadas nas frações FP 4 foram as dos monossacarídeos galactose e arabinose, sugestivos da possível presença de arabinanos e galactanos nestas frações. Nas frações FP 4 de *Dioclea altíssima* e *Canavalia brasiliensis* observou-se prevalência do monossacarídeo galactose, enquanto que na fração de *Cratylia floribunda*, tanto a galactose quanto a arabinose estão em concentrações semelhantes (22,4 e 21,4%), respectivamente.

A



Gal Ara Man Xyl Glu Da Cf Cb

B



Gal Ara Man Xyl Glu Da Cf Cb

FIGURA 16. Cromatografia em camada delgada dos polissacarídeos obtidos das frações (A) FP 1 e (B) FP 4. Da esquerda para a direita nas duas placas: padrões de galactose, arabinose, manose, xilose, glucose; frações glicídicas de *Dioclea altissima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*.

TABELA 2. Composição monossacarídica percentual das frações polissacarídicas de sementes de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*.

Frações	Monossacarídeo (mol%)						
	Glu	Gal	Man	Xyl	Ara	Fuc	Rha
FP 1 <i>D. altíssima</i>	85,60	5,90	0,51	2,10	5,60	0,35	-
FP 4 <i>D. altíssima</i>	69,40	14,10	0,89	4,20	10,30	0,57	0,59
FP 1 <i>C. floribunda</i>	93,30	2,40	0,33	0,17	3,80	-	-
FP 4 <i>C. floribunda</i>	46,80	22,40	0,80	5,90	21,40	0,90	1,80
FP 1 <i>C. brasiliensis</i>	92,40	2,50	0,40	1,80	2,90	-	-
FP 4 <i>C. brasiliensis</i>	52,50	26,60	1,30	4,60	13,80	0,60	0,60

7.6. Isolamento e caracterização dos receptores solúveis presentes nos extratos salinos de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis*

Na literatura, ainda são escassas as pesquisas acerca de ligantes endógenos de lectinas. Rudiger *et al.*, (2000), citam evidências da interação de lectinas de sementes com componentes de membranas dos corpos protéicos ou com outras proteínas de reserva, sendo essas interações mediadas aparentemente por forças iônicas. Os contatos naturais entre as proteínas de reserva seriam, assim, induzidos pela estrutura altamente compacta dos corpos protéicos e não pela característica peculiar das lectinas de reconhecerem e interagirem com glicoconjugados endógenos. As lectinas de leguminosas, desse modo, existiriam apenas para desempenhar a manutenção das membranas dos corpos protéicos. Porém, deve-se considerar, sobretudo, a afinidade química existente entre as proteínas de reserva na formação destas organelas.

É bastante evidente que a principal característica das lectinas de reconhecer e ligar especificamente a carboidratos não deva ser casual e possivelmente deve ter alguma relevância para as funções biológicas destas proteínas *in vivo*; para tanto, pressupõe-se que deva haver receptores glicídicos nos tecidos dos quais as lectinas também sejam derivadas, como também em outras células ou glicoconjugados com os quais estejam destinadas a interagir (MOREIRA, 1998).

Alguns receptores endógenos solúveis de lectinas já foram descritos em sementes de *Dioclea sclerocarpa* (TAVARES, 2002), *Pisum sativum*, *Canavalia ensiformis*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* e *Ricinus communis* (GANSERA *et al.*, 1979), *Vicia sativa* (GEBAUER *et al.*, 1979) e *Cratylia floribunda* (RAMOS *et al.*, 2002). A ocorrência de tais receptores tem sido registrada em quantidades muito baixas em comparação ao teor de lectinas destas sementes, o que faz aumentar a especulação sobre suas significâncias na funcionalidade endógena das lectinas.

7.6.1. Cromatografias de afinidade dos extratos salinos totais em coluna de Sepharose-4B com lectinas imobilizadas.

Os extratos salinos totais das farinhas das três sementes foram obtidos a partir da extração em solução salina durante 3 horas sob agitação contínua e posterior centrifugação. Pressupondo-se que as lectinas possam interagir com receptores solúveis possivelmente presentes nos extratos salinos destas sementes, os extratos foram cromatografados em colunas de Sepharose - 4B ativadas com as lectinas imobilizadas.

As colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM para favorecer a interação das lectinas com seus receptores solúveis. Foram aplicados volumes iguais de 200 mL de extratos salinos totais às colunas.

Foram obtidos um pico não-retido (P 1) e um pico retido (P 2). Os picos retidos das três cromatografias foram eluídos com tampão glicina 0,1M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM pH 2,6 (figuras 17, 18 e 19). Esses picos ainda apresentaram atividade hemaglutinante, com títulos de 256 UH/mL, indicativo da presença de lectinas nestas frações. Os receptores que interagiram com as lectinas imobilizadas foram eluídos no P 2, porém ainda ligados com as lectinas remanescentes do extrato salino.

A análise do perfil eletroforético das frações correspondentes aos picos P 1 e P 2 permite supor que, quando o extrato é aplicado à coluna de Sepharose contendo a lectina imobilizada, os receptores tanto podem estar interagindo com as lectinas presentes no extrato salino, como também com as que estão imobilizadas na coluna. Conforme o padrão de bandas protéicas dos picos P 1 e P 2, as colunas de Sepharose-lectina não foram capazes de separar os receptores das lectinas presentes no extrato. As bandas protéicas correspondentes a estas frações são visualizadas nas figuras 23 e 24.

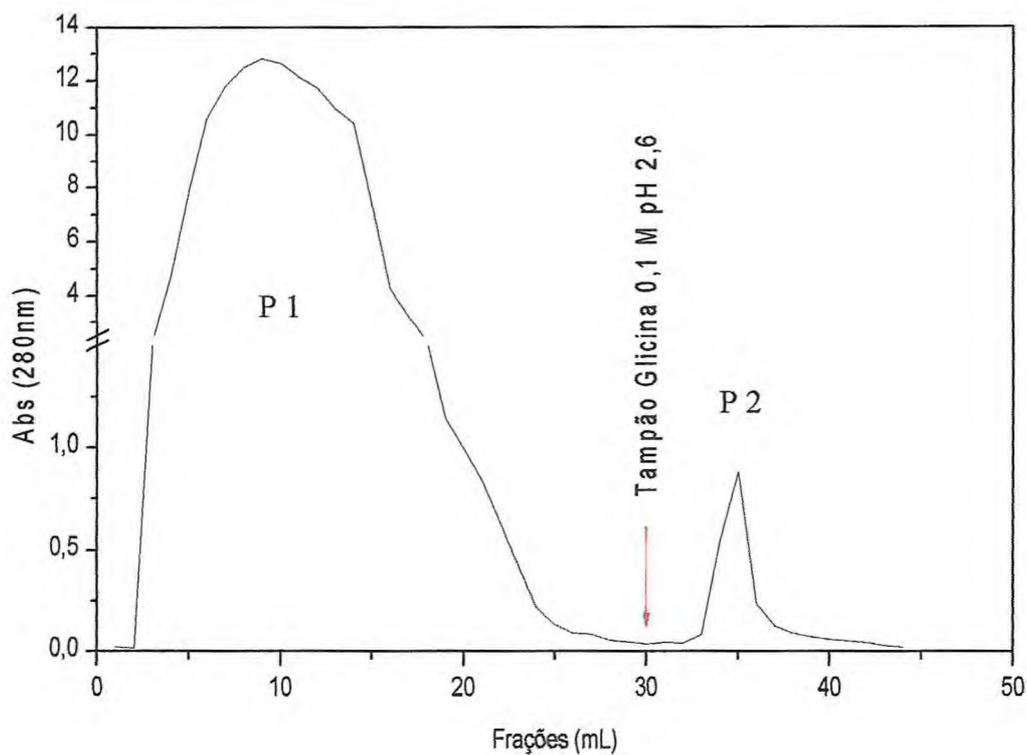


FIGURA 17. Cromatografia do extrato salino total de *Cratylia floribunda* em coluna de Sepharose-4B com lectinas de *Cratylia floribunda* imobilizadas. A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M com Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. O pico 2 foi eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Frações de 2,6 mL foram coletadas sob fluxo contínuo de 0,3 mL/min.

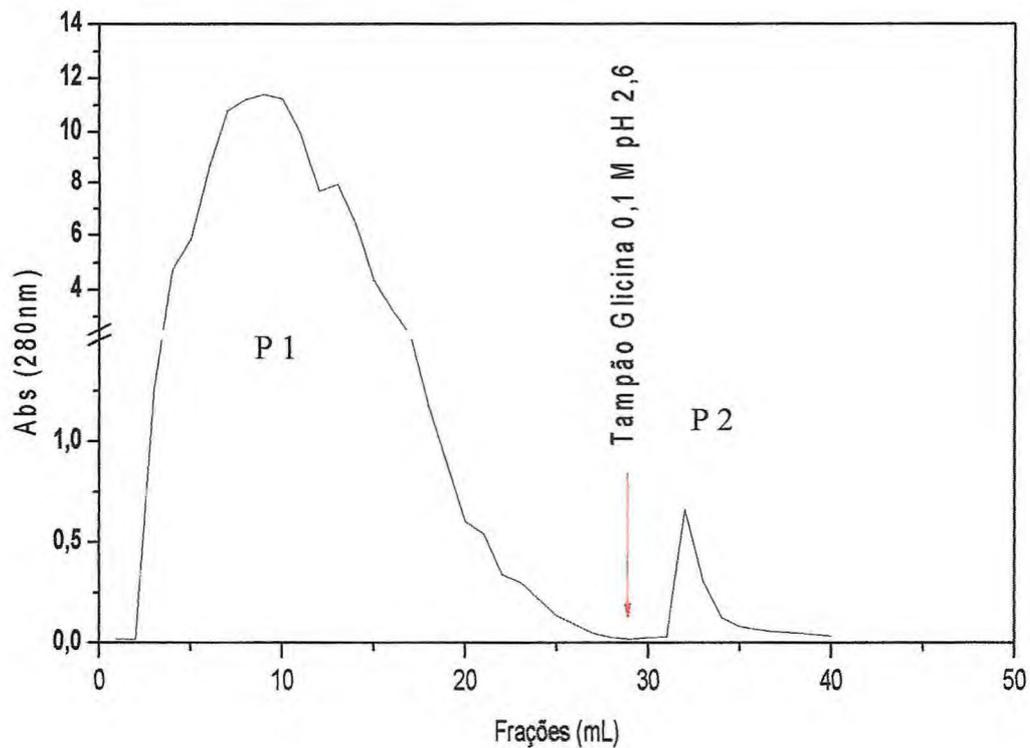


FIGURA 18. Cromatografia do extrato salino total de *Canavalia brasiliensis* em coluna de Sepharose-4B com lectinas de *Canavalia brasiliensis* imobilizadas. A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M com Ca^{++} e Mn^{++} 5mM. O pico 2 foi eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Frações de 2,6 mL foram coletadas sob fluxo contínuo de 0,3 mL/min.

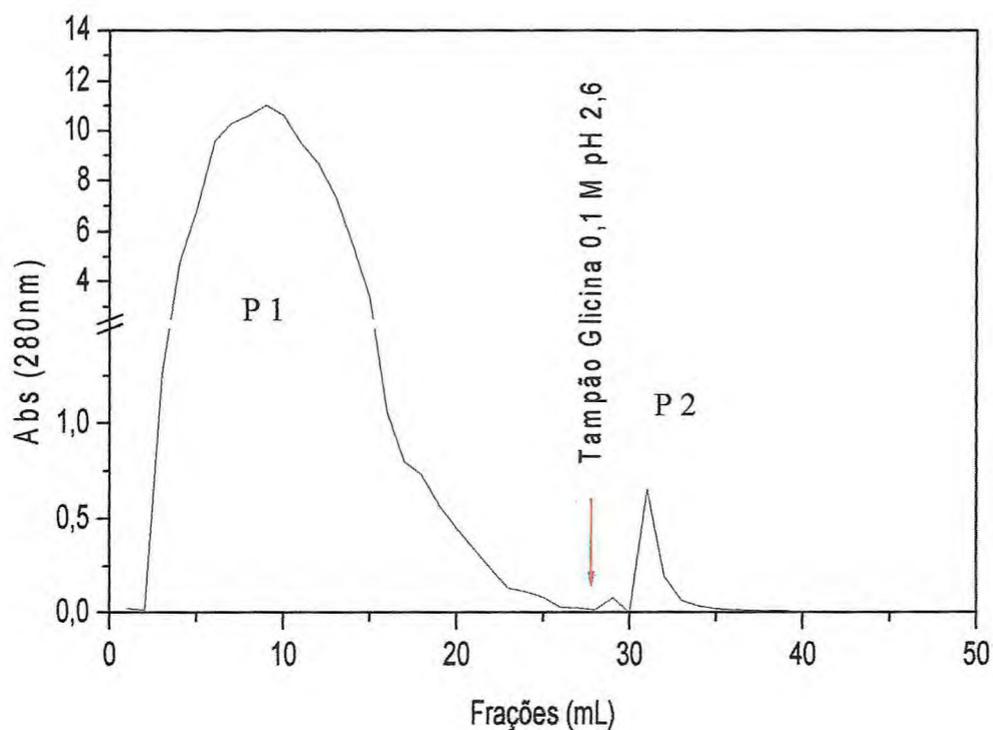


FIGURA 19. Cromatografia do extrato salino total de *Dioclea altissima* em coluna de Sepharose-4B com lectinas de *Dioclea altissima* imobilizadas. A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. O pico 2 foi eluído com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Frações de 2,6 mL foram coletadas sob fluxo contínuo de 0,3 mL/min.

7.6.2. Cromatografias seqüenciadas em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose-lectina

Como não foi possível separar o par lectinas-receptores solúveis por cromatografias dos extratos salinos totais em colunas de Sepharose-lectinas, uma segunda tentativa foi realizada. Para tanto, foram realizadas cromatografias de afinidade dos picos retidos (P 2) em sistema seqüenciado de cromatografias em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose-lectinas.

Após a eluição do material não-retido (pico SL 1) com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM, as colunas foram eluídas separadamente com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Conforme as figuras 20, 21 e 22, foi eluído um pico retido da coluna de Sephadex G-50 (pico S 2) e um pico retido da coluna de Sepharose-lectinas (pico SL 2).

Os picos designados de S 2, eluídos das colunas de Sephadex G-50 corresponderam às lectinas que interagiram com a matriz de polidextrana, conforme análise do perfil eletroforético (figuras 24 e 25) em condições desnaturantes e ensaio de atividade hemaglutinante.

Foram observadas atividades hemaglutinantes em todos os picos obtidos nestas cromatografias, com títulos de 256 UH/mL para leituras de atividade óptica de 0,5, excetuando-se nas frações correspondentes aos picos não-retidos das colunas de Sepharose-lectinas (SL 1), correspondendo aos possíveis receptores solúveis das lectinas de *Cratylia floribunda*, *Dioclea altissima* e *Canavalia brasiliensis*.

Conforme a análise destes resultados, as moléculas receptoras presentes nos extratos salinos possivelmente interagiram com as lectinas imobilizadas nas colunas de Sepharose-lectinas durante as cromatografias analisadas no item 7.6.1., entretanto, os receptores ainda foram eluídos juntamente com o excedente de lectinas presentes nos picos P 2. Com a cromatografia dos picos P 2 contendo o par lectina-receptor, em coluna de Sephadex G-50, as lectinas interagiram com a matriz, sendo eluídas nos picos retidos S 2. Os receptores livres das lectinas foram assim eluídos nos picos não-retidos (SL 1) por cromatografia contínua em coluna de Sepharose-lectina. Os picos retidos (SL 2) desta última coluna corresponderam ao excedente de receptores que interagiram com a matriz de Sepharose-lectinas e que foram eluídos com o excedente de lectinas ainda presentes no meio, revelando-se conforme perfil eletroforético, como bandas correspondentes às bandas das lectinas, bem como às correspondentes aos receptores solúveis (figuras 23 e 24).

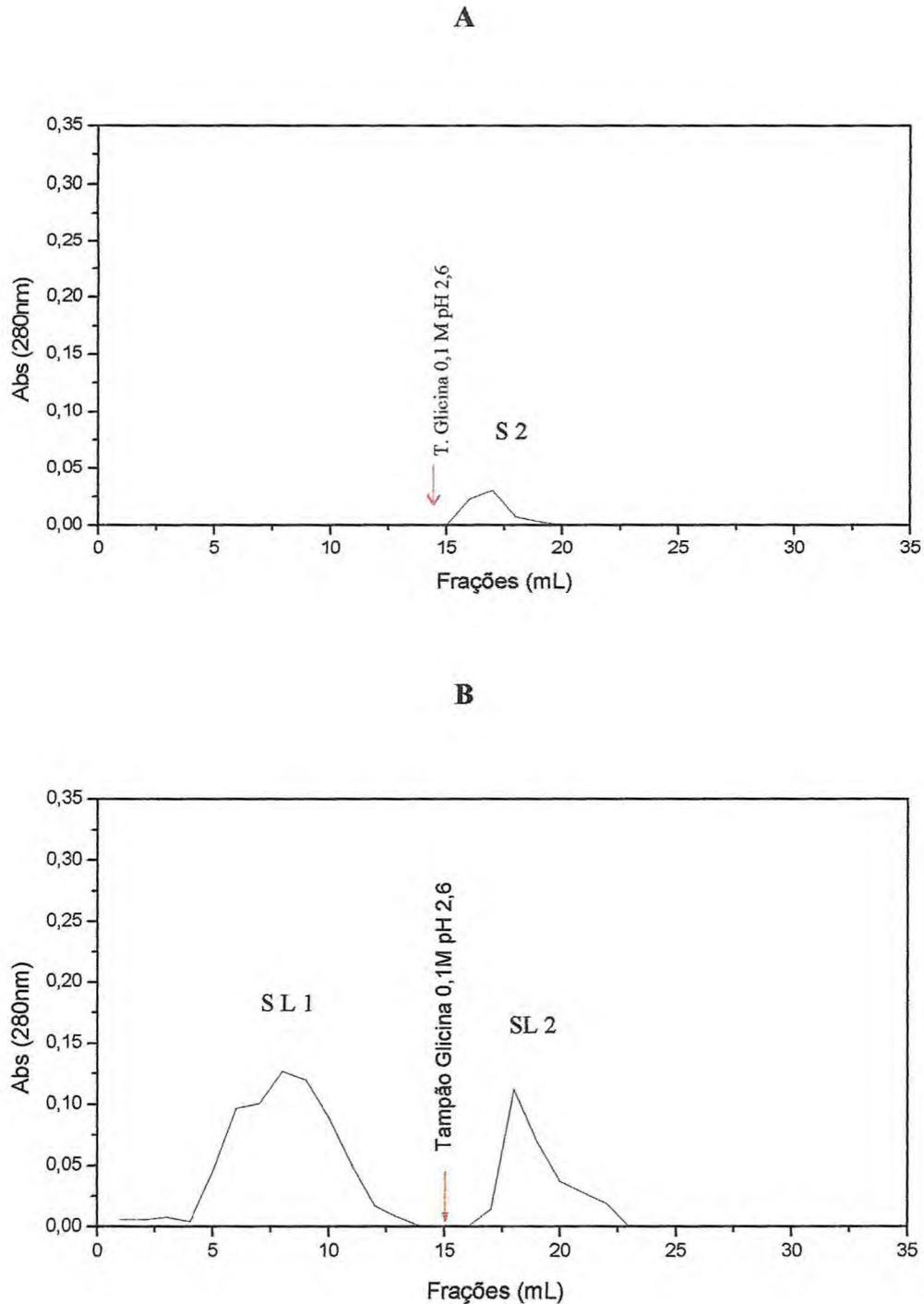


FIGURA 20. Cromatografias seqüenciadas em colunas de (A) Sephadex G-50 e (B) Sepharose-lectina de *Cratylia floribunda*. Aplicado o pico retido (P 2) da cromatografia do extrato total em coluna de Sepharose-lectina às colunas acopladas. As colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Os picos retidos foram eluídos com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Frações de 2,6 mL foram coletadas sob fluxo contínuo de 0,3 mL/min.

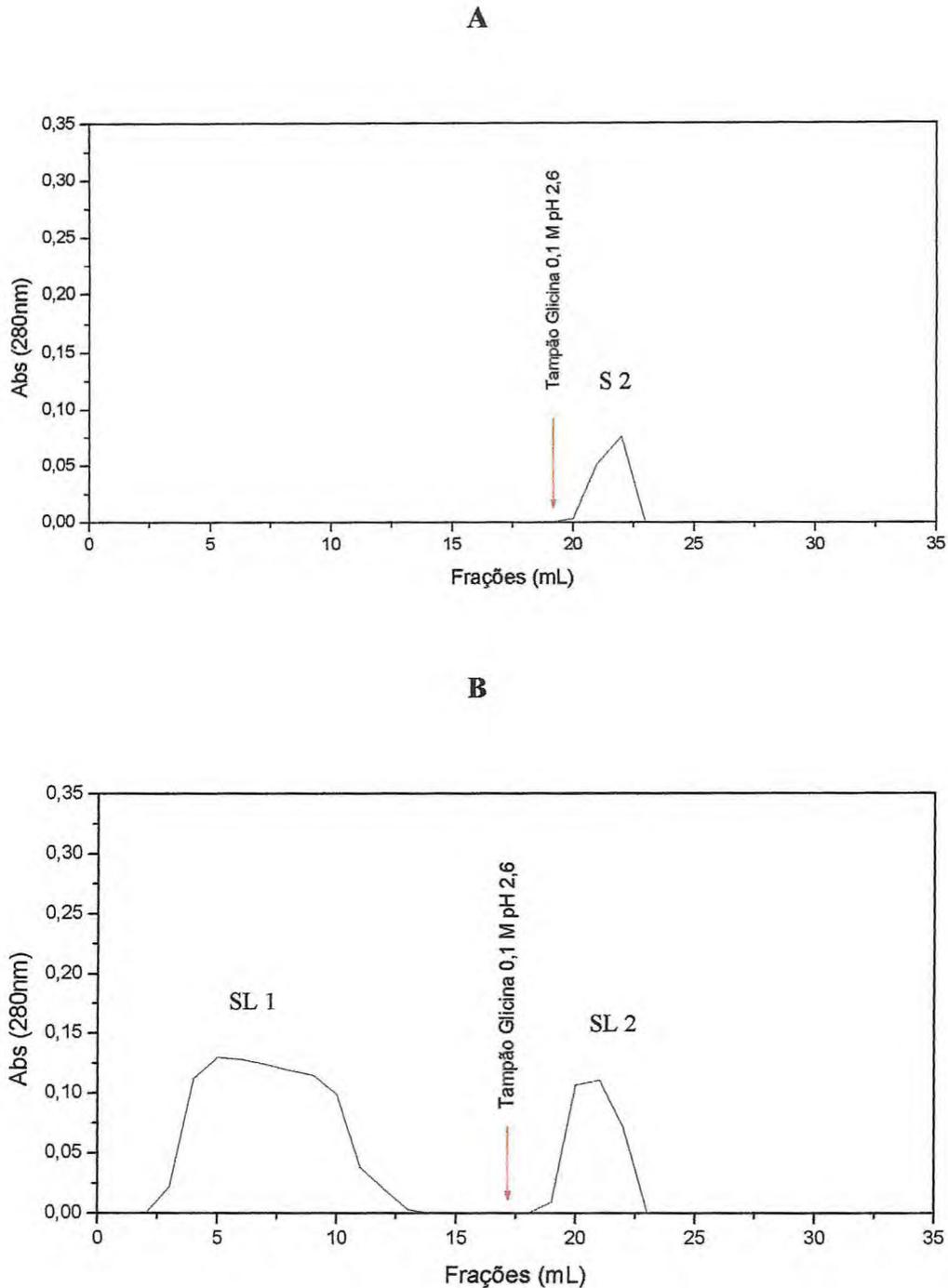


FIGURA 21. Cromatografias seqüenciadas em colunas de (A) Sephadex G-50 e (B) Sepharose-lectina de *Canavalia brasiliensis*. Aplicado o pico retido (P 2) da cromatografia do extrato total em coluna de Sepharose-lectina às colunas acopladas. As colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Os picos retidos foram eluídos com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M e Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Frações de 2,6 mL foram coletadas sob fluxo contínuo de 0,3 mL/min.

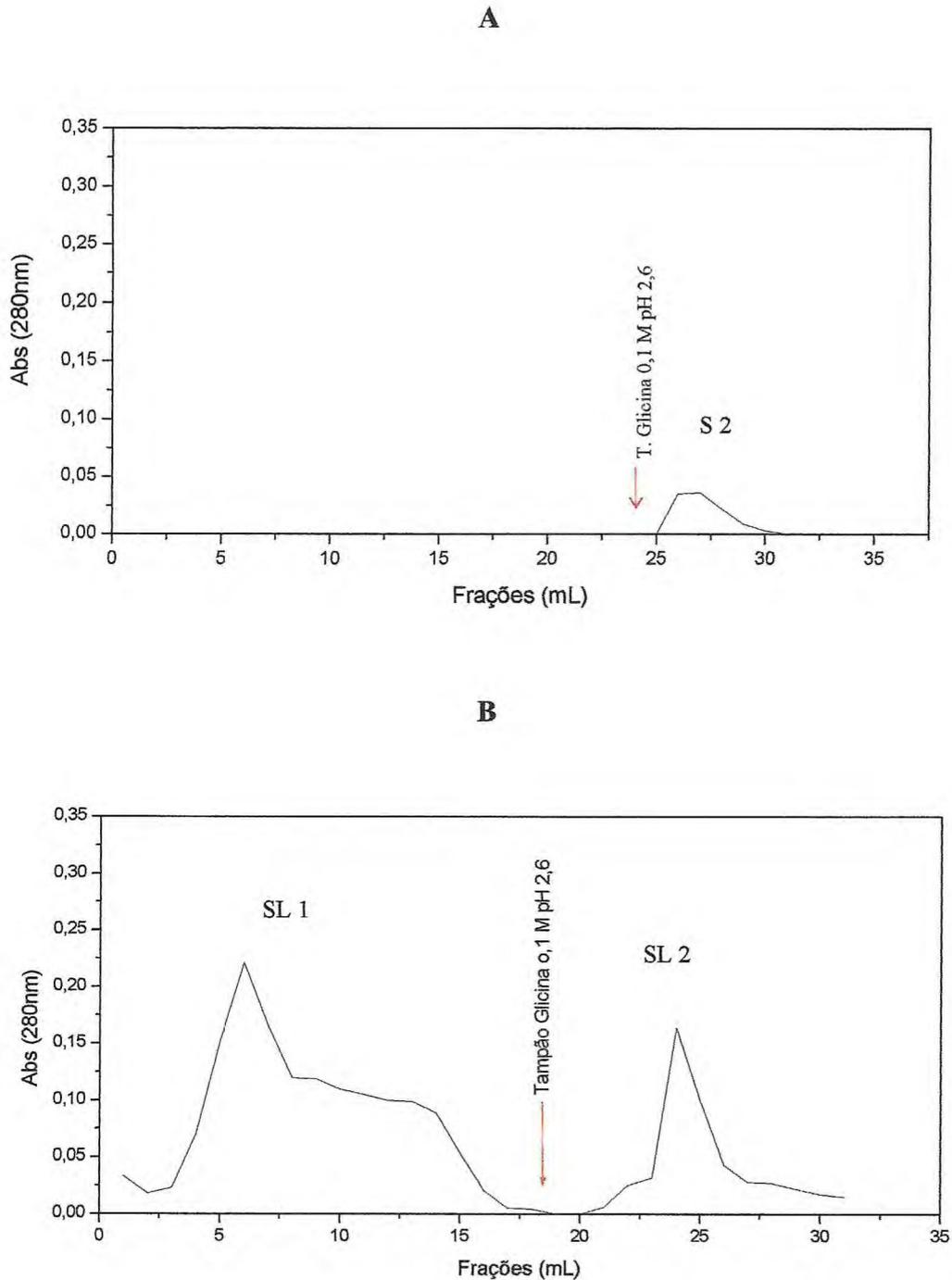


FIGURA 22. Cromatografias seqüenciadas em colunas de (A) Sephadex G-50 e (B) Sepharose-lectina de *Dioclea altíssima*. Aplicado o pico retido (P 2) da cromatografia do extrato total em coluna de Sepharose-lectina às colunas acopladas. As colunas foram equilibradas com NaCl 0,15 M contendo Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Os picos retidos foram eluídos com tampão glicina 0,1 M pH 2,6 contendo NaCl 0,15 M Ca^{++} e Mn^{++} 5 mM. Frações de 2,6 mL foram coletadas sob fluxo contínuo de 0,3 mL/min.

7.6.3. Eletroforeses dos receptores solúveis em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Conforme análise do perfil eletroforético, todos os picos retidos das cromatografias em sistema seqüenciado apresentaram bandas correspondentes ao padrão das lectinas das espécies de Diocleinae estudadas: com massas moleculares de aproximadamente 30 kDa para a cadeia α , 17 kDa para o fragmento β e entre 13 e 15 kDa para o fragmento γ , além de outras bandas protéicas.

As massas moleculares dos receptores solúveis (SL 1) foram estimadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, conforme as figuras 23, 24 e 25, tendo como referência os seguintes padrões: BSA (66,0 kDa); Ovoalbumina (45,0 kDa); Gliceraldeído-3-P desidrogenase (36,0 kDa); Anidrase carbônica (30,0 kDa); Tripsinogênio (24,0 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa). As eletroforeses em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS / PAGE) dos receptores solúveis na presença e ausência de β -mercaptoetanol, revelaram duas bandas protéicas de massas moleculares aparentes de aproximadamente 66 kDa e 70 kDa.

Sugere-se, de acordo com o perfil cromatográfico e eletroforético, que os receptores solúveis das lectinas extraídas das três sementes pertencentes a espécies distintas da subtribo Diocleinae são possivelmente proteínas com as mesmas características moleculares. Tavares (2002) isolou o par lectina - receptor solúvel de sementes de *Dioclea sclerocarpa*. Segundo o autor, o extrato total dessas sementes contém um receptor solúvel com padrão de bandas semelhante ao da lectina de *Dioclea sclerocarpa*, diferindo deste apenas em uma banda protéica com massa molecular aparente ligeiramente menor do que o fragmento mais leve da lectina.

Na tentativa de esclarecer se os receptores solúveis detectados neste trabalho seriam de natureza glicoprotéica, duas eletroforeses iguais foram coradas separadamente. A primeira lâmina, corada de modo convencional com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,05% em água: ácido acético: metanol (60:10,5:79,5; v/ v/ v) durante 1 hora. A segunda foi corada com o reagente de Schiff para visualização de glicoproteínas. Os resultados obtidos revelaram a ausência de bandas coradas com o reagente de Schiff.

É possível que a porção glicídica presente na estrutura da molécula receptora, provavelmente, seja insuficiente para ser corada com o reagente. Resultado semelhante descreve o autor supracitado em seus experimentos de caracterização do receptor solúvel de *Dioclea sclerocarpa*.

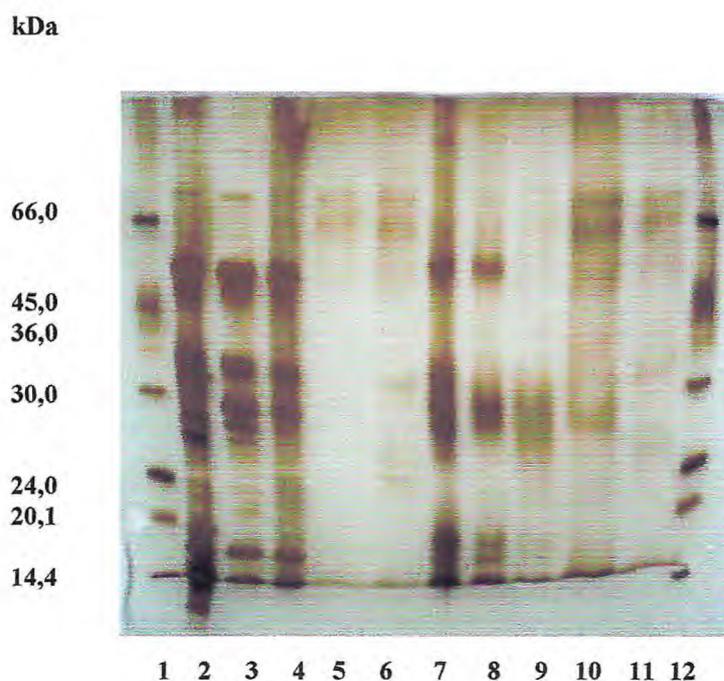


FIGURA 23. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol dos extratos de *Dioclea altissima* e *Cratylia floribunda* e frações obtidas das cromatografias em colunas de Sepharose-lectinas e Sephadex G-50. **1 e 12:** Marcadores de massa molecular; **2:** Extrato bruto de *Dioclea altissima*; **3:** P 1 de *Dioclea altissima* em Sepharose-lectina; **4:** P 2 de *Dioclea altissima* em Sepharose-lectina; **5:** SL 1 de *Dioclea altissima* Sepharose-lectina; **6:** SL 2 de *Dioclea altissima* em Sepharose-lectina; **7:** Extrato bruto de *Cratylia floribunda*; **8:** P 1 de *Cratylia floribunda* em Sepharose-lectina; **9:** P 2 de *Cratylia floribunda* em Sepharose-lectina; **10:** SL 1 de *Cratylia floribunda* Sepharose-lectina; **11:** SL 2 de *Cratylia floribunda* em Sepharose-lectina. Marcadores de massa molecular: BSA (66,0 kDa); Ovoalbumina (45,0 kDa); Gliceraldeído-3-P desidrogenase (36,0 kDa); Anidrase carbônica (30,0 kDa); Tripsinogênio (24,0 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa).

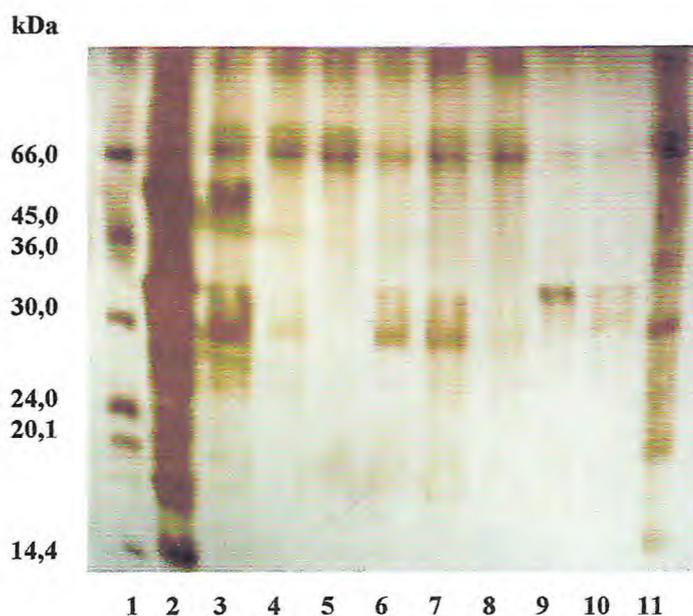


FIGURA 24. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% na presença de SDS e β -mercaptoetanol do extrato de *Canavalia brasiliensis* e frações obtidas das cromatografias em colunas de Sepharose-lectina e Sephadex G-50. **1 e 11:** Marcadores de massa molecular; **2:** Extrato bruto; **3:** P 1 em Sepharose-lectina; **4:** P 2 Sepharose-lectina; **5 e 8:** SL 1 Sepharose-lectina; **6 e 7:** S 2 em Sephadex G-50; **9 e 10:** SL 2 em Sepharose-lectina. Marcadores de massa molecular: BSA (66,0 kDa); Ovoalbumina (45,0 kDa); Gliceraldeído-3-P desidrogenase (36,0 kDa); Anidrase carbônica (30,0 kDa); Tripsinogênio (24,0 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa).

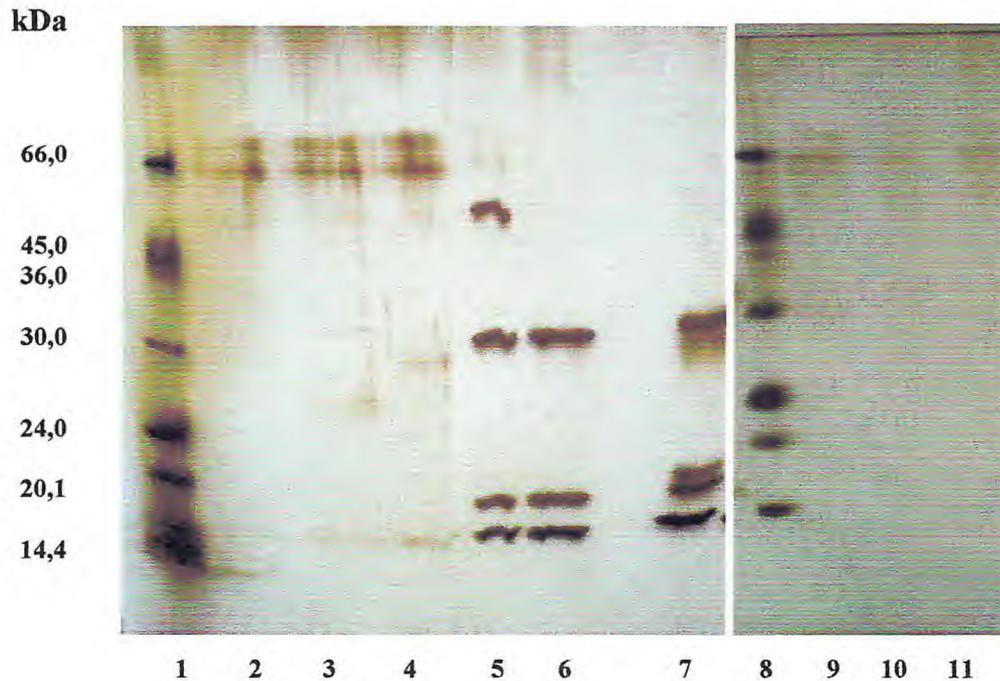


FIGURA 25. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% dos receptores solúveis das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima* e frações obtidas das cromatografias em colunas de Sepharose-lectina e Sephadex G-50. 1 e 8: Marcadores de massa molecular; 2, 3 e 4: Receptores solúveis das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima* (na presença de β -mercaptoetanol); 5: SL 2 (*D. altissima* em Sepharose-lectina); 6: S 2 (*D. altissima* em Sephadex G-50); 7: S 2 (*C. floribunda* em Sephadex G-50); 9, 10 e 11: Receptores solúveis das lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia floribunda* e *Dioclea altissima* (sem β -mercaptoetanol). Marcadores de massa molecular: BSA (66,0 kDa); Ovoalbumina (45,0 kDa); Gliceraldeído-3-P desidrogenase (36,0 kDa); Anidrase carbônica (30,0 kDa); Tripsinogênio (24,0 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa); α -lactoalbumina (14,4 kDa).

7.6.4. Determinação quantitativa de glicídios dos receptores solúveis

As concentrações de carboidratos dos picos retidos das cromatografias dos extratos salinos em colunas de Sepharose-lectinas (P 2) foram determinadas utilizando-se galactose como monossacarídeo padrão. As concentrações de carboidratos foram estimadas com relação a uma curva padrão de galactose variando de 10 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de concentração.

De acordo com a curva padrão, foram encontradas concentrações percentuais de 2,76%, 2,2% e 1,4% das frações glicídicas nas soluções protéicas dos P 2 de *Dioclea altissima* (18 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *Canavalia brasiliensis* (11,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e *Cratylia floribunda* (12,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente, em colunas de Sepharose 4B-lectinas.

Apesar dos percentuais encontrados, os resultados não são conclusivos para caracterização dos receptores solúveis das lectinas como glicoproteínas, visto que não foi possível quantificar com precisão, através dessa técnica as frações glicídicas dessas proteínas. Os picos protéicos analisados não corresponderam somente aos receptores purificados (figuras 24 e 25), conforme perfis eletroforéticos. Os picos correspondentes aos receptores solúveis isolados (SL 1 da coluna de Sepharose-lectina) foram obtidos em baixas concentrações para a quantificação de possíveis frações glicídicas a partir dessa técnica.

7.6.5. Determinação do poder inibitório dos receptores solúveis sobre a atividade hemaglutinante das lectinas

Para determinar o poder inibitório dos receptores solúveis, foram realizados ensaios seriados de inibição da atividade hemaglutinante conforme descrito no item 6.10.5. As frações contendo os receptores solúveis (SL 1 da cromatografia em Sepharose-lectina) não foram capazes de inibir a ação hemaglutinante das lectinas das três sementes estudadas. Este fato pode ser explicado se a interação lectina-hemácias for mais forte que a interação lectina-receptor solúvel.

Utilizando-se lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea altissima* e *Cratylia floribunda*, (0,4 mg/ml) observou-se que todas elas ainda apresentaram a titulação mínima de 256 UH/mL frente a hemácias de coelho a 2% na presença do possível receptor, possivelmente por concentração excessiva de lectinas presentes no meio. Entretanto,

estudando o poder inibitório do extrato salino de *Dioclea sclerocarpa*, sobre a atividade hemaglutinante da lectina de *Dioclea altissima* com título de 64 UH/mL frente hemácias de coelho a 2% , Tavares (2002) comprovou a existência dos receptores solúveis naquele extrato, capazes de interagir com a lectina e inibir totalmente sua atividade.

RESUMO DOS RESULTADOS

8. Resumo dos resultados

1. Lectinas glucose/manose – ligantes das sementes de *Dioclea altíssima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda*, extraídas das farinhas com solução de NaCl 0,15 M, podem ser isoladas por cromatografia de afinidade em colunas de resíduos brutos reticulados com epícloridrina segundo Appukuttan *et al.*, 1977.
2. As colunas dos resíduos brutos reticulados das três sementes apresentaram melhor teor de retenção para a lectina de *Canavalia brasiliensis*. A lectina de *Dioclea altíssima* teve melhor retenção nas colunas de resíduos reticulados de *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* do que no resíduo da própria semente. Os três resíduos apresentaram os menores teores de retenção para a lectina de *Cratylia floribunda*.
3. Os resíduos brutos foram fracionados com NaOH 1M e NaOH 4 M e as frações obtidas, FP 1 e FP 4, respectivamente, foram submetidas à hidrólise enzimática do amido. As frações FP 1 apresentaram maior teor de retenção lectínica. A fração FP 1 de *Canavalia brasiliensis* reteve maior concentração de lectina (7,0 µg/mg de polissacarídeo) quando comparada com as frações FP 1 de *Dioclea altíssima* e FP 1 de *Cratylia floribunda* (4,5 µg/mg).
4. As composições monossacarídicas das frações FP 1 e FP 4 de *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* por cromatografia de camada delgada e cromatografia líquido-gasosa apresentaram maiores concentrações do monossacarídeo glucose em relação aos demais monossacarídeos presentes. Os monossacarídeos galactose, manose, xilose, arabinose e traços de fucose e ramnose estão presentes em todas as frações analisadas. Dentre estes, as maiores concentrações observadas foram dos monossacarídeos galactose e arabinose.

5. Receptores solúveis capazes de interagir com as lectinas de *Dioclea altíssima*, *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia floribunda* foram isolados por cromatografias de afinidade seqüenciadas em colunas de Sephadex G-50 e Sepharose – lectinas.
6. Os receptores solúveis não foram capazes de inibir a ação hemaglutinante das lectinas das três sementes estudadas frente a hemácias de coelho a 2%, possivelmente devido ao fato da interação lectina-hemácias ser mais favorável que a interação lectina-receptor.
7. Por eletroforese SDS-PAGE com e sem β -mercaptoetanol, os receptores solúveis apresentaram-se como duas bandas protéicas de massas moleculares aparentes de aproximadamente 66 kDa e 70 kDa.
8. Nossos resultados mostraram que as lectinas glucose/manose – ligantes das sementes de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea altíssima* e *Cratylia floribunda* interagem com receptores solúveis e insolúveis endógenos presentes nas farinhas dessas sementes.

CONCLUSÃO

9. Conclusão

Lectinas de diferentes gêneros da subtribo Diocleinae: *Dioclea altíssima*, *Cratylia floribunda* e *Canavalia brasiliensis* interagem com receptores glicídicos endógenos solúveis e insolúveis. Os resíduos brutos reticulados dessas sementes formam excelentes matrizes de afinidade para o isolamento dessas lectinas. Os receptores solúveis endógenos de massas moleculares aparentes de 66 kDa e 70 kDa, presentes no extrato protéico, foram isolados por cromatografia de afinidade e o conhecimento de suas estruturas poderá ser a chave para elucidar as funções biológicas das lectinas nas sementes.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

10. Referências bibliográficas

ABDEL-MASSIH R. M.; BAYDOUN, E. A.; BRETT, C. T. In vitro biosynthesis of 1,4- β -galactan attached to a pectin-xylloglucan complex in pea. **Planta**, **216**, 502-511, 2003.

AGGARWAL, P.; DOLLIMORE, D. A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch. **Thermochimica acta**, **319**, 17-25, 1998.

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B.; MAPURUNGA, S. Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamniom seaforthii* and *Bryothamniom triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **7**, 15-19, 1995.

AINOUZ, I. L.; MOREIRA, R. A.; CAMPOS, F. A. P.; RICHARDSON, M.; BEGBIE, R.; STEWART, J. C.; WATT, W. B.; PUSZTAI, A. The isolation and amino acid sequence of the beta and gama subunits of the lectins from the seeds of *Dioclea grandiflora*. **Phytochemistry**, **26** (5), 1435-1440, 1987.

ALENCAR, N. M. N.; TEIXEIRA, E. H.; ASSREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A.; RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, **8**: 107-113, 1999.

AL-KAISEY, M. T.; WILKIE, C. B. The polysaccharides of agricultural lupin seeds. **Carbohydrate Research**, **227**, 147-161, 1992.

ALVES, M. A. O.; CUSTÓDIO, A. V. C. Citogenética de leguminosas coletadas no estado do Ceará. **Revista Brasileira de Genética**, **12** (1), 81-92, 1989.

APPUKUTTAN, P. S.; SUROLIA, A.; BACHHAWAT, B. K. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian J. Biochem. Biophys.**, **14**, 382-384, 1977.

ARGEL, P. J.; HIDALGO, C.; GONZÁLEZ, J.; LOBO, M.; ACUÑA, V.; JIMÉNEZ, C. 1995. Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf>>. Acesso em 10/08/2006.

BABA, K.; OGAWA, M.; NAGANO, A.; KURODA, H.; SUMIYA, K. Developmental changes in the bark lectin of *Sophora japonica* L. **Planta**, **183**, 462-470, 1991.

BANERJI, N.; SARKAR, K. K.; DAS, A. K. And arabinoxylan from the mucilage of the leaves *Litsea polyantha*. **Carbohydrate research**, **147**, 165-168, 1986.

BANERJEE, R.; DAS, K.; RAVISHANKAR, R.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex. **J. Mol. Biol.**, **259**, 281-296, 1996.

BANERJEE, R.; MANDE, S. C.; GANESH, V.; DAS, K.; DHANARAJ, V.; MAHANTA, S. K.; SUGUNA, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal structure of peanut lectin, a protein with an unusual quaternary structure. **Proc Natl Acad. Sci.**, **91**: 227-231, 1994.

BARJA-FIDALGO, C.; LIMA, J.E.; SAMPAIO, A.L., HENRIQUE, M. G. Lymphocyte activation and cytokine production by *Pisum sativum* agglutinin (PSA) in vivo and *in vitro*. **Immunopharmacology**, **41** (2), 147-155, 1999.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; SANTOS, W. L.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A., CAVADA, B. S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/C mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta tropica**, **60** (4), 237-250, 1996.

BARRE, A.; LAUCA, J.; ROUGÉ, P. The three-dimensional structure of lectins: a phonetic and phylogenetic tool for the Leguminosae. **Biochem. Sistem. Ecology**, **22** (4), 401-407, 1994.

BECKER, J. W.; REEJE, G. N.; WANG, J. L.; CUNNINGHAM, B. A.; EDELMAM, G. M. The covalent structure and three-dimensional structure of Concanavalin A III. Structure

of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **Journal of Biological Chemistry**, **250** (4), 1513-1524, 1975, citado por Van Damme *et al.*, 1998.

BENTO, C. A. M.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leucocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and actions**, **38**, 48-54, 1993.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. Plenum Press, New York, 2 ed., 445 p. 1994.

BIELESKI, R. L. Frutan hydrolysis drives petal expansion in the ephemeral daylily flower. **Plant Physiology**, **103**, 213-219, 1993.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS H. J. **Electrophoresis**, **8** (2), 93-99, 1987.

BOURNE, Y.; MAZURIER, J.; LEGRAND, D.; ROUGE, P.; MONTREUIL, J. SPIK, G.; CABBILLAU, C. Structures of a legume lectin complexed with the human lactotransferin N2 fragment, and with an isolated biantennary glycopeptide: role of the fucose moiety. **Structure**, **2**, 209-219, 1994.

BOURNE, Y.; ROUGE, P.; CABBILLAU, C. X- ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex refined at 2.3 Å resolution. **Journal of Biological Chemistry**, **267**(1), 197-203, 1992.

BOURNE, Y.; ROUSSEL, A.; FREY, M.; ROUGE, P.; FONTECILLA-CAMPS, J. C.; CABBILLAU, C. Three-dimensional structures of complex of *Lathyrus ochrus* isolectin I with glucose and mannose: Fine specificity of the monosaccharide-binding site. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, **8**, 365-376, 1990.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, **119**, 419, 1954.

- BOWLES, D. J.; MARCUS, S. Characterization of receptors for the endogenous lectins of soybean and jackbean seeds. **FEBS Letters**, **129**, 135-138, 1981.
- BRAGA, R. C. Uso de galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima* para isolamento de lectina galactose-ligante. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE, 95 pp., 2001.
- BROWN, R. M. Jr.; SAXENA, I. M.; KUDLICKA, K. Cellulose biosynthesis in higher plants. **Trends in plant science. Reviews**, **1** (5), 149-156, 1996.
- BUCKERIDGE, MS, AIDAR MPM, SANTOS HP, TINÉ MA. Acúmulo de Reservas. In: FERREIRA A.G.; BORGHETTI F. **Germinação – Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 31-50, 2004.
- BUCKERIDGE, M.S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, **38**, 141 -156, 2000a.
- BUCKERIDGE, M. S.; TINÉ, M. A.; SANTOS, H. P.; LIMA, D. U. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **12**, 137-162, 2000b.
- BUCKERIDGE, M.S.; DIETRICH, S.M.C. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboidae). **Plant Science**, **117**, 33-43, 1996.
- BUCKERIDGE, M. S.; REID, J. S. G. Major cell wall storage polysaccharides in legume seeds: Structure, catabolism and biological functions. **Journal of the Association for the Advancement of Science**, **48** (3), 153-162, 1996.
- CALVETE, J.J.; COSTA, F. H. F.; SAKER-SAMPAIO, S.; MURCIANO, M. P. M.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; BLOCH, JR. C.; SILVEIRA, S. B.; FREITAS, B. T.; SAMPAIO, A. H. The amino acid of the agglutinin

isolated from the red marine alga *Bryothamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cell. Moll. Life Sci.**, **57**, 343-350, 2000.

CARPITA, N. C. Hemicelulosic polymers of cell walls of *Zea* coleoptiles. **Plant Physiology**, **72**, 515-521, 1983.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D.M. Structural models primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of cell wall during growth. **Plant Journal**, **3**, 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN M. The Cell Wall. In: BUCHANAN, W.; GRUISSEM, R. J. **Biochemistry & Molecular Biology of Plant**, American Society Physiologists, 2000.

CARRINGTON, D. M.; AUFFRET, A.; HANKE, D. E. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, **313**, 64-67, 1985.

CASSAB, G. I. Plant cell wall proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, **49**, 281-309, 1998.

CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; CORDEIRO, E. F.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **8** (1), 31-36, 1996a.

CAVADA, B. S.; RAMOS, M. V.; CORDEIRO, E. F.; GRANGEIRO, T. B.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; CARVALHO, A. F. F. U.; MOREIRA, R. A. Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **8** (1), 37-42. 1996b.

CAVADA, B. S.; MOREIRA-SILVA, L. I. M.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; BARRAL-NETTO, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; GOMES, J.C.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A. Purification and biological properties of a lectin from *Canavalia brasiliensis* Lind. seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. In: Van

Driessche, E.; Fisher, J.; Beeckmans, S.; Bog-Hansen, T. C. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, 11, Textop, Denmark. 1996c.

CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J.T.A.; GRANGEIRO, T. B. Primary structures and functions of plant lectins. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 5 (2), 193- 202, 1993.

CHAMBAT, G.; BARNOUD, F; JOSELAU, J P. Structure of the primary cell walls of suspension – cultured *Rose glauca* cells. I. Polysaccharides associated with cellulose. **Plant Physiology**, 74, 687-693, 1984.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKEL, N. V. Lectins, lectins genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, 3, 1-9, 1991.

CHRISPEELS, M. J.; HARTL, P. M.; FAYE, L. Characterization of the endoplasmic reticulou-associated precursor of concanavalin A. **Journal of Biological Chemistry**, 261 (22), 10021-10024, 1986.

DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; CECCATTO, V. M.; SOUSA, F. A. M.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. Thermodynamic binding studies of lectins from the Diocleinae subtribe to deoxy of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, 275 (21), 16119-16126, 2000.

DAM, T. K.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; SANTOS, C. F.; SOUSA, F. A. M.; OSCARSON, S.; BREWER, C. F. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oliosaccharides and differential specificities for complex carbohydrate. **Journal of Biological Chemistry**, 273 (20), 12082-12088, 1998.

DARLEY, C. P.; FORRESTER, A. M.; McQUEEN-MASON, S. J. The molecular basis of plant cell wall extension. **Plant Mol Biol.**, 47, 179-195, 2001.

DEA, I.C.M.; CLARK, A.H.; McCLEARY, B.V. Effect of galactose substitution-pattern on the interaction properties of galactomannans. **Carbohydrate Research.**, **147**, 275-294, 1986.

DEA, I. C. M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, **31**, 241-312, 1975, citado por Buckeridge *et al.*, 2000b.

DEREWENDA, Z.; YARIV, J.; HELLIWELL, J. R.; KALB, A.J.; DODSON, E. J.; PAPIZ, M. Z.; WAN, T.; CAMPBELL, J. The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A. **EMBO J.**, **8** (8), 2189-2193, 1989.

DRICKAMER, K. Multiplicity of carbohydrate interactions. **Nature Struct. Biol.**, **2**, 437-439, 1995.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry.**, **28** (3), 350-356, 1956.

DU PUY, D. J.; LABAT, J-N.; RABEVOHITRA, R.; VILLIERS, J-F.; BOSSER, J.; MOAT, J. The Leguminosae of Madagascar. **RBG Kew**, 750 p., 2002.

EINHOFF, W.; FLEISCHMANN, G.; FREIER, T.; KUMMER, H.; RUDIGUER, H. Interaction of leguminous seed lectins with seed proteins – lectins as packing aids of storage proteins, in: Driessche, E. V.; Bog-Hansen, T. C., (Eds.), **Lectins: Biol., Biochem., Clinical Biochem.**, **5**, 45-52, 1986.

EMONS, A. M. C.; MULDER, B. M. How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. **Trends in Plant Science**, **5**, 35-40, 2000.

ETZLER, M. E. Plant lectins: molecular and biological aspects. **Annual Review Plant Physiology**, **36**, 209-234, 1985.

FRY, S. C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, **161**, 641-675, 2003.

FRY, S.C. Cross-linking of Matrix Polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms. **Annual Review Plant Physiology**, **37**, 165-186, 1986.

GANSERA, R.; SCHURZ, H.; RUDIGER, H. Lectin associated proteins from the seeds of Leguminosae. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, **360**, 1579-1585, 1979.

GARROS-ROSA, I. Galactomananas de *Parkinsonia aculeata* L. Caracterização estrutural e aplicações no isolamento de lectinas ligantes de galactose. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 116 pp., 2000.

GASPAR, Y.; JOHNSON, K. L.; McKENNA, J. A.; BACIC, A.; SCHULTZ, C. J. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. **Plant Mol. Biol.** **47**, 161-176, 2001.

GEBAUER, G.; SCHLITZ, E.; SCIMPL, A.; RUDIGER, H. Purification and characterization of a mitogenic lectin and lectin binding protein from *Vicia sativa*. **Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.**, **360**, 1727, 1979.

GOMES, J.C.; EPSTEIN, M.; MAFFIA, L.M.; SANT' ANNA, R. Composição química de sementes do feijão-bravo e de seu isolado protéico. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, **31** (3), 443-459, 1988.

GOODWIN, T.W.; MERCER, E.I., The Plant Cell Wall. In: **Introduction to Plant Biochemistry**, Pergamon Press, New York, 55-91, 1983.

GRANGEIRO, T. B.; SCHIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B. S. Molecular cloning and characterization of Conbr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European Journal of Biochemistry**, **248**, 43-48, 1997a.

GRANGEIRO, T. B.; GATEHOUSE, J. A.; PEREIRA, M. N.; CAVADA, B. S. Investigation of the origin of the naturally occurring fragments of *Cratylia floribunda* lectin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 9 (1), 9-13, 1997b.

GUZMÁN, J. M.; HERNANDEZ, G. L. Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corumbosa* (L.) Raf., Convolvulaceae. **Phyton**, 42, 1-8, 1982.

HATFIELD, R.D. Structural Polysaccharides in Forages and Their Digestibility. **Agron. J.**, 18, 39-46, 1989.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. Protein purification applications: A practical approach. **The Practical Approach Series**. Oxford University Press. U. K., 178 pp., 1995.

HAASZ, D.; FREY, R.; THISEN, M.; KAUSS, H. Partial purification of a hemagglutinin associated with cell walls from hypocotyles of *Vigna radiata*. **Planta**, 151, 490 p., 1981.

HIRST, E.L.; JONES, J.K.N.; WALDER, W.O. Pectic substances. Part 7. The constitution of the galactan from *Lupinus albus*. **Journal of Chemical Society**, 1225-1229, 1947, citado por Buckeridge *et al.*, 2000b.

HORTA-BARROS, A. C.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; CRISOSTOMO PINTO, F. S.; ALMEIDA-SILVA, L. M.; MOREIRA, R. A. Receptores endógenos de lectinas de sementes da tribo Diocleinae. XI Reunião Nordestina de Botânica, Fortaleza, **Livro de resumos**, 1987.

HUEFS, Fichas, 1995. Ficha para descritores, com informação colhida no HUEFS. Disponível em: <<http://umbuzeiro.cnip.org.br/db/forrag/taxa/17035.shtml>> Acesso em 10/08/2006.

INA, C.; SANO, K.; YAMAMOTO-TAKAHASHI, M.; MATSUSHITA-OIKAWA, H.; TAKEKAWA, H.; TAKEKARA, Y.; UEDA, H.; OGAWA, H. Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1726, 21-27, 2005.

JUNG, H.G., Forage Lignins and Their Effects on Fiber Digestibility. *Agron. J.*, **81**, 33-38 1989.

KOCOUREK, J. Historical background, in: **The lectins, Properties, Functions, And Applications in Biology and Medicine**, Liener, I. E.; Sharon, N.; Goldstein, I. J.(Eds.), Academic Press, 1-32, 1986.

KUGA, S.; BROWN, R. M. Jr. **Physical structure of cellulose microfibrils: implications for biogenesis, in biosynthesis and biodegradation of cellulose.** Haigler, C. H.; Weiner, P. J.(Eds.), 125-142. 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the Bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685, 1970.

LANDSTEINER, K.; RAUBITSCHKEK, H. Beobachtungen über Hämolyse und Hämagglutination. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, **45**, 600–607. 1907, citado por Van Damme; Peumans., 1998.

LASCANO, C. 1995. Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf> > Acesso em 10/08/2006.

LEWIS, G. P. **Kew Legumes of Bahia**, Royal Botanic Gardens, 369 pp., 1987.

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. **The lectins: Properties, Functions, and Applications in Biology and Medicine** (Eds.), Academic Press. Orlando, Fl., 371-435, 1986.

LIMA, R. S. N. Goma de cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) como biossensor para lectinas vegetais. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 125 pp., 2002.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, **98**, 637-674, 1998.

- LIS, H.; SHARON, N. Application of lectins. in: Liener, I. E.; Sharon, N.; Goldstein, I. J. **The Lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine.** Academic Press Inc. New York, 1986.
- MAKELA, O. Studies in haemagglutinins of leguminosae seeds. **Annales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae**, **35** (11), 7-133, 1957, citado por Van Damme; Peumans, 1998.
- MALDONADO, H. G.; LOPEZ, O. P. Amylolitic enzymes and products derived from starch: a review. **Critical Reviews in food Science and Nutrition**, **35** (5): 373-403, 1995.
- MARASCHIN, M.; CAROBREZ, S. G., PERSIKE, D.; PEIXOTO, M.L.; FERREIRA, A. G.; FERRACIN, R.; VERPOORTE, R.; FONTANA, J. D. Cell wall polysaccharides from *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) cultured cells: straction and chemical structure. **Carbohydrate Polymers**, **41**, 55-60, 2000.
- MATOS, V. C. Gomas endospermicas de *Delonix regia* e *Schizolobium parahybae*. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE, 113pp., 2000.
- MAXWELL, R. H. The Genus *Dioclea* (Fabaceae) in the New World. **Ph.D. Thesis**, Department of Biology, Southern Illinois University, 430 p. 1969.
- MAYWORM, M. A. S.; SERRA DO NASCIMENTO, A.; SALATINO, A. Seeds of species from the caatinga: proteins, oils and fatty acid contents. **Revista Brasileira de Botânica** **21**(3), 299-303, 1998.
- McCANN, M. C.; ROBERTS, K. Architecture of the primary cell wall, in: Loyd, C. W. (Ed.) **The cytoskeletal basis of plant growth and form.** London, Academic Press, 109-129, 1991.
- MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Caracterização estrutural de 3 lectinas apresentando especificidade por açúcar distintas, isoladas de sementes de Fruta-Pão (*Artocarpus incisa*).

Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

MOREIRA, R. A., Lectinas vegetais: uma abordagem química e físico-química. **Tese de Titular.** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 600p, 1998.

MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. M.; HORTA, A. C.; OLIVEIRA, J. T. Isolation and characterization of *Dioclea altíssima* var. *megacarpa* seed lectin. **Phytochemistry**, **46** (1), 139-144, 1997.

MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; MARTINS, J. L.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J.T.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violácea* Benth seeds. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **8** (1), 23-29, 1996.

MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; CAVADA, NUNES, E. P.; FERNANDES, A. G.; OLIVEIRA, J.T.A. Lectins and the chemotaxonomy of the sub-tribe Diocleinae (Leguminosae-Phaseoleae) **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **7** (1), 7-14, 1995.

MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; NUNES, E. P.; FERNANDES, A. G.; OLIVEIRA, J.T.A. Plant seed lectins. A possible marker for chemotaxonomy of the genus *Canavalia*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **5** (2), 127-132, 1993.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, **26** (2), 113-120. 1984.

MOREIRA, R. A.; BARROS, A.C. H.; STEWART, J.C.; PUSZTAI, A. Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). **Planta**, **158**, 63-69, 1983.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterisation of a lectin from the seeds of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, **59**, 783-787, 1977.

NAGAI, K.; YAMAGUCHI, H. Direct demonstration of the essential role of the intramolecular high-mannose oligossacharide chains in the folding and assembly of soybean (*Glycine max*) lectin polypeptides. **Jounal Biochemistry**, **113**, 123-125, 1993.

NAISMITH, J. H.; ENMERICH, C.; HABASH, J.; HARROP, S. T.; HELLIWELL, J. R.; HUNTER, W. N.; RAFTERY, J.; KALB, A. J. (GILBOA); YARIV, J. Refined structure of Concanavalin A with methyl α -D-mannopyranoside at 2.0 Å resolution and comparasion with the saccharide-free structure. **Acta Cryst., D.**, **50**, 847-858, 1994.

NAISMITH, J. H.; HABASH, J.; HARROP, S. T.; HELLIWELL, J. R.; HUNTER, W. N.; WAN, T. C. M.; WEISGERBER, S.; KALB, A. J. (GILBOA); YARIV, J. Refined structure of CADMIUM-SUBSTITUTED Concanavalin A at 2.0 Å resolution. **Acta Cryst., D.**, **49**, 561-571, 1993.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3 ed. 2000.

NEUMANN, D.; LEHR, C. M.; LENHOF, H. P.; KOHLBACHER, O. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, **56** (4): 437-457, 2004.

NOGUEIRA, N. A. Purificação e caracterização biológica de lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) produzida em *Escherichia coli*. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 95p., 1999.

NSIMBA-LUBAKI, M.; PEUMANS, W. J. Seasonal fluctuations of lectins in the barks of elderberry (*Sambucus nigra*) and black locust (*Robinia pseudoacacia*). **Plant Physiology**, **80**, 747-751, 1986.

OLIVEIRA, J.T.A.; VASCONCELOS, I. M.; GONDIM, M.J.L.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, L.I.M. *Canavalia brasiliensis* seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 64 (4), 417-424, 1994.

OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart seeds. **Revista Brasileira de Botânica**, 14, 61-66, 1991.

PARIKH, I.; CUATRECASAS, P. Affinity chromatography: A valuable technique for purifying enzymes, studying cell interactions, and exploring hormone receptors may also have potential in treating disease. **Special Report**, 17-30, 1985.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 33 (3), 209-258, 1998.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin as plant defence proteins. **Plant Physiology**, 109, 347-352, 1995.

PINTO, V. P. T.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S. Lectinas em cancerologia: revisão. **Revista do Centro de Ciências da Saúde, Unifor**, 11, 144-152, 1999.

PIZARRO, E. A.; CARVALHO, M. A.; RAMOS, A. K. B. 1995. Disponível em: <http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf> >. Acesso em 10/08/2006.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H.; STIRTON, C. H. Revolution and systematics of the Leguminosae. In: POLHILL; RAVEN (Eds.), **Advances in legume systematics**. Parte I, Richmond, England, 425 pp., 1981.

POPPER, Z. A.; FRY, S. C. Widespread occurrence of a covalent linkage between xyloglucan and acidic polysaccharides in suspension-cultured angiosperm cells. **Ann Bot.** 96, 91-99, 2005.

PROSEUS, T. E.; ORTEGA, J. K. E.; BOYER, J. S. Separating growth from elastic deformation during cell enlargement. **Plant Physiology**, **119**, 775-784, 1999.

QUEIROZ, L. P.; CORADIN, L. 1995. Disponível em: < <http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf> >. Acesso em 10/08/2006.

RAMOS, M. V.; BONFIM, I. R.; BANDEIRA, G. P.; DEBRAY, H. Evidences of endogenous lectin receptor in seeds of the legume *Cratylia floribunda*. **Braz. J. Plant Physiol.**, **14** (13), 195-202, 2002.

RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A.; ROUGÉ, P. Interaction of lectins from the sub-tibe Diocleinae with specific ligands. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, **8**, 193-199, 1996a.

RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S.; ROUGÉ, P. The carbohydrate-binding specificity and molecular modelling of *Canavalia marítima* and *Dioclea grandiflora* lectins. **Memórias do Insituto Oswaldo Cruz**, **91**, 761-766, 1996b.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. **Plant Biochemistry**, **5**, 205-234, 1997.

REID, J.S.G. **Structure and function in legume-seed polysaccharides**, in: Brett, C. (Ed.) **Biochemistry of the plant cell walls**. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 259-268. 1985.

REIS, D.; VIAN, B. Helicoidal pattern in secondary cell walls and possible role of xylans in their construction. **C. R. Biologies**, **327**, 785-790, 2004.

REIS, D.; VIAN, B.; CHANZY, H.; ROLAND, J. C. Liquid-crystal-type assembly of native cellulose-glucuronoxylans extracted from plant cell wall. **Biol. Cell.**, **67**, 173-178, 1991.

REITER, W-D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. **Current Opinion in Plant Biology**, **5**, 536-542, 2002.

- RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. D. A. P.; MOREIRA, R. A.; AINOUS, I. L.; BEGBIE, R.; WATT, W. B.; PUSZTAI, A. The complete amino acid sequence of the major α subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. **European Journal of Biochemistry**, **144**, 101-111, 1984.
- RICHARDSON, J. S. The anatomy and taxonomy of protein structure. **Adv. Protein Chem.**, **34**, 167-339, 1981.
- RIDLEY, B. L.; O'NEILL, M. A.; MOHNEN, D. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. **Phytochemistry**, **57** (6), 929-967, 2001.
- RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; MOREIRA, R. A.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/manose-binding plant lectins. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **25**, 823-826, 1992.
- ROLAND, J. C.; REIS, D.; VIAN, B. Liquid crystal order and turbulence in the planar twist of the growing plant cell walls. **Tissue and Cell**, **24**, 335-345, 1992.
- ROLAND, J. C.; REIS, D.; VIAN, B.; MOSINIAK, S-J, M. Morphogenesis of plant cell at the supramolecular level. Internal geometry and versatility of helicoidal expression. **Protoplasma**, **140**, 75-91. 1987.
- ROUGÉ, P.; RICHARDSON, M.; RANFAING, P.; YARWOOD, A.; CAVADA, B. S. Single and two chains legume lectins as filogenetics markers of speciation. **Biochim. Systematic and Ecology**, **15** (3), 341-348, 1987.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W, Plant Physiology and Plant Cells, in: **Plant Physiology**, Wadsworth, Inc., Belmont, CA, 3-26, 1992.
- SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectins suggests a correlation between

its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, **405**, 114-118, 1997.

SARIKAYA, E.; HIGASA, T.; ADACHI, M.; MIKAMI, B. Comparison of abilities of α - and β - amylases on raw starch granules. **Process Biochemistry**, **35** (7): 711-715, 2000.

SAUER, J. Revision of *Canavalia*. **Brittonia**, **16** (2), 106-181, 1964.

SELVENDRAN, R.R. The Chemistry of Plant Cell Walls. In: **Dietary Fibre**. Applied Science Publ., London, 95-147, 1983.

SESHAGIRIRAO, K.; LEELAVATHI, C.; SASIDHAR, V. Cross-linked *Leucaena* seed gum matrix: an affinity chromatography tool for galactose-specific lectins. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, **38** (3), 370-372, 2005.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, **14**, 53-62, 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Legume Lectins – a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, **4**, 3198-3207, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. Chapman and Hall, London, 126 p., 1989.

SINGH, R. S.; TINARY, A. K.; KENNEDY, J.F. Lectins: source, activities and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, **19** (2), 145-18, 1999.

SILVA, S. S. M.; KUMAR, N. S.; AMAN, P. Structural studies of an arabinoxylan isolated from the leaves of *Neolitsea cassia*. **Carbohydrate research**, **152**, 229-236, 1986.

SOMERVILLE, C.; BAUER, S.; BRININSTOOL, G.; FACETTE, M.; HAMANN, T.; MILNE, J.; OSBORNE, E.; PAREDEZ, A.; PERSSON, S.; RAAB, T.; VORWERK, S. YOUNGS, H. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. **Science**, **306** (5705), 2206-2211, 2004.

- SOUSA, F. B.; OLIVEIRA, M. C. 1995. Disponível em: <<http://www.ciat.cgiar.org/forrajes/pdf>>. Acesso em 10/08/2006.
- STILLMARK, H., Über ricin, ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis*. L. und einige anderen euphorbiaceen. **Inaugural Dissertation Dorpat**, Tartu, 1888, citado por Van Damme; Peumans, 1998.
- STURM, A.; BERGWERFF, A. A.; VLIEGENTHART, F. G. H-NMR structural determination of the N-linked carbohydrate chains on glycopeptides obtained from the bean lectin phytohemagglutinin. **European Journal of Biochemistry**, **204**, 313-316, 1992.
- STURM, A.; CHRISPEELS, M. J. The high mannose oligosaccharide of phytohemagglutinin is attached to Asn¹² and the modified oligosaccharide to Asn⁶⁰. **Plant Physiology**, **81**, 320-322, 1986.
- SUMMER, J. B.; HOWELL, S. F. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, **32**, 227-237, 1936, citado por Derewenda, *et al.*, 1989.
- SWAMY, N. R.; SALIMATH, P. V. Arabinans from *Cajanus cajan* cotyledon. **Phytochemistry**, **30**, 263-265, 1991.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. São Paulo, 2002.
- TAVARES, R. O. Sementes de *Dioclea sclerocarpa* Ducke: um sistema endógeno lectina-receptor. Fortaleza. CE. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, 117 pp., 2002.
- TAVARES, R. O. Galactomana de *Adenantha pavonina* L. Aplicação para o Isolamento de Lectinas Galactose-Específicas. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 95 pp. 1998.

- TEIXEIRA, D. M. A. Isolamento e caracterização de lectinas e seus ligantes polissacarídicos de sementes de *Mucuna sloanei*. **Tese de Doutorado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 126 pp, 2005.
- TEIXEIRA, D. M. A. Goma exsudada de *Spondias purpúrea*, uma nova matriz para o isolamento de lectinas galactose ligantes. **Dissertação de Mestrado**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 80 pp., 2001.
- TINÉ, M. A. S. Mobilização de xiloglucano de reserva em sementes de *Hymenaea courbaril* L., **Dissertação de mestrado**. Campinas, Unicamp, 85 p., 1997.
- THOMPSON, J.E.; FRY, S.C. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. **Planta**, **211**: 275–286, 2000.
- VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Science**, **17** (6), 575-692, 1998.
- VAN DAMME, E. J. M.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W.J. Isolation, characterization and molecular cloning of the bark lectins from *Maackia amurensis*. **Glycoconjugate J.**, **14**, 449-456, 1997.
- VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGE, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W.J. The seed lectins of black locust (*Robinia pseudoacacia*) are encoded by two genes which differ from the bark lectin genes. **Plant Mol. Biol.**, **29**, 1197-1210, 1995.
- VAN EIJSDEN, R. R.; DE PATER, B. S.; KIJNE, J. W. Mutations analyses of the sugar binding site of pea lectin. **Glycocojugate Journal**, **11**, 375-380, 1994.
- VAN EIJSDEN, R. R.; HOEDEMAEKER, F. J.; DIAZ, C. L.; LUGTENBERG, B. J. J.; DE PATER, B. S.; KIJNE, J. W. Mutations analyses of pea lectin. Replacement of Asn¹²⁵

by Asp in the monosaccharide-binding site eliminates mannose/glucose binding activity. **Plant Mol. Biol.**, **20**, 1049-1058, 1992.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J.; PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, **183**, 258-262, 1991.

VASCONCELOS, I. M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, **15**, 137-154, 1991.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Curr Opin Struct Biol.**, **9** (6), 707-714, 1999.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review Biochemistry**, **65**, 441-473, 1996.

WILLATS, W. G. T., MCCARTNEY, L., KNOX, J. P. In-situ analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, **213** (1), 37-44, 2001.

YAMAMOTO, K.; MARUYAMA, I. N.; OSAWA, T. Cyborg lectins: novel leguminous lectins with unique specificities **Biochemistry Journal**, **127** (1), 137-142, 2000.

YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; IRIMURA, T. Sialic acid-binding motif of *Maackia amurensis* lectins. **Biochemistry Journal**, **121**, 756-761, 1997.

YAMAMOTO, K.; ISHIDA, C.; SAITO, M.; KONAMI, Y.; OSAWA, T.; IRIMURA, T. Cloning and sequence analysis of the *Maackia amurensis* haemagglutinin cDNA. **Glycoconjugate Journal**, **11**, 572-575, 1994.

YOKOYAMA, R.; NISHITANI, K. Genomic basis for cell-wall diversity in plants. A comparative approach to gene families in rice and *Arabidopsis*. **Plant and Cell Physiology** **45** (9), 1111-1121, 2004.

ZAVADZKI-BAGGIO, S. F.; SIERAKOWISKI, M. R.; CORREA, J. B. C.; REICHER, F.
A linear (1→5)-linked α -L-arabinofuranan from the seeds of Guapuruvu (*Schizolobium parahybum*). *Carbohydrate research*, 233, 265-269, 1992.